DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE

Anwendung zur Analyse von Aminosäuren und Dinitrophenylaminosäuren, Unterschiede zwischen Dünnschicht-Chromatographie und anderen Chromatographier-Verfahren, Entwicklung eines Durchlauf-Verfahrens

Teildruck der

INAUGURALDISSERTATION

zur
Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ALOIS NIEDERWIESER

aus Laupheim (Deutschland)

1962

Springer-Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg
1962

DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE

Anwendung zur Analyse von Aminosäuren und Dinitrophenylaminosäuren, Unterschiede zwischen Dünnschicht-Chromatographie und anderen Chromatographier-Verfahren, Entwicklung eines Durchlauf-Verfahrens

Teildruck der

INAUGURALDISSERTATION

zur
Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ALOIS NIEDERWIESER

aus Laupheim (Deutschland)

Springer-Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg
1962

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. M. Brenner und Dr. C. Grob.

Basel, den 27. November 1962 Prof. Dr. M. Eichler
Dekan

Herrn Alois Georg Niederwieser wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 27. 11. 1962 erlaubt, diesen Teildruck seiner am 27. 11. 1962 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

Dünnschicht-Chromatographie

Anwendung zur Analyse von Aminosäuren und Dinitrophenyl-aminosäuren, Unterschiede zwischen Dünnschicht-Chromatographie und anderen Chromatographier-Verfahren, Entwicklung eines Durchlauf-Verfahrens

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Institut für Organische Chemie der Universität Basel
2. in der Universitätsbibliothek Basel
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek Bern

Separatdruck aus E. Stahl, Dünnschicht-Chromatographie,
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962

Herrn Prof. Dr. Max Brenner danke ich herzlich für seine vorbildliche Anleitung zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten, ganz besonders für die große Freiheit in der Wahl des Forschungsgegenstandes und der praktischen Durchführung der Dissertation. Meinen lieben Kollegen G. Pataki und H. Fuchs danke ich für die äußerst anregenden Diskussionen über diese Arbeit, dem Kultusministerium Baden-Württemberg für eine Studienbeihilfe.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546021_0043

Einleitung

Der Zusammenhang zwischen dünnschichtchromatographischem Verhalten und chemischer Struktur und das Problem der Besonderheiten der Dünnschichtchromatographie haben den Gegenstand einer Gemeinschaftsarbeit von Alois Georg Niederwieser und György Pál Pataki gebildet. Es wäre unzweckmäßig, die Beiträge der Bearbeiter getrennt darzustellen. Die vorliegende Fassung enthält das Gesamtergebnis.

Für den Stoff auf den Seiten 103—107, 110—117 und die Abb. 66a ist Herr Pataki, für die Abb. 64b und den Rest ist Herr Niederwieser verantwortlich.

M. Brenner

II. Chromatographisches Verhalten und chemische Struktur

1. Beziehungen von Verteilungskoeffizient und Phasenverhältnis zu Rf-Wert und Rententionsvolumen

Das chromatographische Verhalten einer Verbindung in einem gegebenen chromatographischen System[1] wird nach den Ausführungen im

[1] Ein „chromatographisches System" ist durch die äußeren Bedingungen, wie Chromatographier-Technik, stationäre Phase, Fließmittel, Temperatur usw. definiert. Der Ausdruck stammt von R. Pohloudek-Fabini und H. Wollmann [37].

vorstehenden Kapitel zweckmäßig durch den Rf-Wert (Entwicklung eines Chromatogramms) oder das Retentionsvolumen V_R (Elution) beschrieben. Beide Größen sind Funktionen des im betreffenden System gültigen Verteilungs- (Adsorptions-)koeffizienten K′, wobei im Falle einer Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen nach den Definitionsgleichungen von S. 89 und in Anlehnung an die Symbolik nach S. 97 die folgenden Beziehungen gelten:

$$p' = \frac{K' \cdot \varrho}{1 + K' \cdot \varrho} \qquad \frac{1}{K'} = \varrho \left(\frac{1}{p'} - 1 \right).$$

Von praktischer Bedeutung ist dabei, daß K′ für ein Phasenpaar auf einer Chromatographiersäule nicht den gleichen Wert zu haben braucht wie im Scheidetrichter. Die Verhältnisse auf einer Chromatographiersäule sind infolge der möglichen Mitwirkung der festen Phase („Träger") ungleich komplizierter als in einem Glasgefäß [*38*], (vgl. S. 10—11 in [*39*]), [*40*].

Für den Fall der Adsorption kann man aus der Freundlichschen Adsorptionsisotherme und den Definitionen von S. 89 mit $p' + q' = 1$ den obigen Beziehungen ähnliche ableiten, wobei an Stelle des Phasenverhältnisses ϱ eine Funktion des Verhältnisses zwischen der Menge des Adsorptionsmittels und dem Volumen der mobilen Phase tritt; K′ ist hier stark konzentrationsabhängig. Dies ändert aber nichts an der sonstigen Analogie.

Nun ist $p' = Rf$ (S. 95) und ebenso

$$p' = \frac{v_F}{V_R} \quad \text{[S. 97, Gleichung (6a)]}.$$

Es gilt also:

$$\frac{1}{K'} = \varrho \left(\frac{1}{Rf} - 1 \right) \tag{16}$$

bei Entwicklung eines Chromatogramms, und

$$\frac{1}{K'} = \varrho \left(\frac{V_R}{v_F} - 1 \right) = \varrho \frac{V_R - v_F}{v_F} \tag{17}$$

bei Elution

wobei $V_R - v_F$ das z. B. im Gas-Chromatographen leicht bestimmbare „scheinbare Retentionsvolumen" bedeutet[1].

2. Qualitative Regeln

Beim Vergleich von Substanzen bekannter Struktur ist es auf Grund geläufiger Löslichkeitsregeln[2] oft möglich, eine qualitative Aussage über das Verhältnis der zugehörigen K′-Werte zu machen. Nach (16) bzw. (17) entspricht einem größeren K′ ein größerer Rf-Wert bzw. kleineres Retentionsvolumen. In diesem Sinn kann man manchmal nützliche qualitative Voraussagen über das verteilungschromatographische Verhalten machen.

[1] Vgl. S. 16 in [*23*]. Vgl. z. B. auch [*41*]. Keulemans gebraucht die Bezeichnung V'_R, Kovats die Bezeichnung V^0_R.

[2] Vgl. z. B. "The solubility classes" bei R. L. Shriner, R. C. Fuson und D. Y. Curtin in [*42*]. Vgl. ferner S. 8—11 in [*39*], sowie [*41*], [*43*], [*44*].

Das adsorptionschromatographische Verhalten folgt ebenfalls gewissen Regeln. Polare Adsorbentien bevorzugen polare Adsorbenden, und umgekehrt. Das Fließmittel wird auch adsorbiert und steht daher mit den Adsorbenden in Konkurrenz um die zur Verfügung stehende Oberfläche. Ferner zeigt die Erfahrung, daß die Affinität zum Adsorbens mit zunehmender Anzahl von Haftstellen in der Molekel des Adsorbenden zunimmt.

3. Quantitativer Zusammenhang; die Martin-Beziehung

Quantitative Zusammenhänge zwischen Struktur und K′ werden in vielen Fällen sichtbar, wenn man die Werte $\log\left(\frac{1}{Rf}-1\right)$ bzw. $\log(V_R - v_F)$ von Gliedern aus homologen Reihen in einem Koordinatensystem gegen die Anzahl „homologer Bauelemente“[1],[2] oder evtl. deren Logarithmus [*43*] aufträgt: die Punkte liegen oft auf einer Geraden! Das Verhalten anderer Verbindungen aus der betreffenden Reihe kann dann durch Intra- oder Extrapolation vorausgesagt werden.

a) Definition des Rm-Wertes

Die lineare Beziehung zur Anzahl der homologen Bauelemente läßt sich auf Grund von Überlegungen verstehen, die erstmals von Martin angestellt worden sind [*39*]. Der Koeffizient K′ (Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen oder zwischen Flüssigkeit und Gas) ist eine Gleichgewichtskonstante, und als solche nach der leicht abzuleitenden thermodynamischen Beziehung

$$A_{rev} = RT\left[\ln \frac{c'_m}{c'_s} - \ln K'\right] \tag{18}$$

ein Maß für die reversible Arbeit, welche bei konstantem Volumen für den Übertritt von 1 Mol Substanz aus der stationären Phase mit der Konzentration c'_s in die mobile Phase mit der Konzentration c'_m bei der absoluten Temperatur T aufzuwenden ist. Beschränken wir uns auf die Verteilung zwischen flüssigen Phasen und bezeichnen wir die reversible Arbeit für den Fall $c'_m = c'_s = 1$ Mol/Liter als ΔF, so ist

$$\Delta F = -RT \ln K' \tag{19}$$

Man kann nun $\frac{1}{K'}$ von (16) oder (17) in (19) einsetzen. Mit (17) resultiert ein Ergebnis, das hier nicht weiter diskutiert sei, weil es nur im Fall der Elution interessiert[3]. Mit (16) erhält man

$$\Delta F = RT \ln\left[\varrho\left(\frac{1}{Rf}-1\right)\right] \quad \text{bzw.}$$

$$\Delta F = 2{,}3\, RT \log\left[\varrho\left(\frac{1}{Rf}-1\right)\right] \tag{20}$$

[1] Gemeint ist z. B. die Anzahl der CH_2-Gruppen in einem n-Paraffin.

[2] $\log\left(\frac{1}{Rf}-1\right)$: [*45—49*]. $\log(V_R - v_F)$: [*50—52*].

[3] In der Form $\Delta G = RT \cdot \ln K'$ (ΔG = freie Enthalpie) ist (19) in Kombination mit (17) für die Gas-Chromatographie von großer Bedeutung. Vgl. z. B. [*41*], [*53*].

Gleichung (20) sei jetzt auf eine substituierbare Substanz S_0 angewandt; wir schreiben deshalb in Gedanken ΔF_0 an Stelle von ΔF. Nun führen wir in S_0 einen Substituenten X ein. Dadurch wird natürlich die freie Überführungsenergie ΔF_0 um einen Betrag ΔF_X verändert. Ein anderer Substitutient Y wird eine Änderung um den Betrag ΔF_Y bewirken. Nimmt man an, daß bei der gleichzeitigen Einführung von X und Y die Veränderungen additiv sind, und daß die Additivität bei Einführung von mehreren X (z. B. m · X) bzw. Y (z. B. n · Y) bestehen bleibt, so ergibt sich folgender allgemeiner Ausdruck für die Überführungsenergie eines Abkömmlings von S_0:

$$2{,}3\ RT \log\left[\varrho\left(\frac{1}{Rf}-1\right)\right] = \Delta F_0 + m\Delta F_X + n\Delta F_Y + \ldots \qquad (21)$$

und daraus durch Umformung

$$\log\left(\frac{1}{Rf}-1\right) = \frac{\Delta F_0}{2{,}3\ RT} + \frac{m\Delta F_X}{2{,}3\ RT} + \frac{n\Delta F_Y}{2{,}3\ RT} + \ldots\ldots + \log\frac{1}{\varrho} \qquad (21\,a)$$

bzw.

$$Rm = G_0 + mG_X + nG_Y + \cdots + G \qquad (22)$$

mit

$Rm = \log\left(\frac{1}{Rf}-1\right)$ [*45, 54, 55*] (Eine Tabelle zur Umrechnung von Rf in Rm und umgekehrt findet man am Schluß des Buches.)

$G_0 = \Delta F_0/2{,}3\ RT$: Konstante der Grundgruppe S_0[1] [*54, 55*]

$G_\mu = \Delta F_\mu/2{,}3\ RT$: Konstante der Gruppe μ (μ = X, Y . . .)[1] [*54, 55*]

$G = \log 1/\varrho$: Grundkonstante[2]

b) Anwendung des Rm-Wertes

Der Rm-Wert ist nach (22) eine lineare Funktion der Anzahl gleicher Gruppen bei konstanter Anzahl der übrigen Gruppen. Der Beitrag einer bestimmten Gruppe zum Rm-Wert einer gegebenen Substanz wäre danach unabhängig vom Molekelrest und von der Stellung der Gruppe in der Molekel. Dies kann natürlich nur annäherungsweise richtig sein. Sobald einzelne Gruppen sich gegenseitig beeinflussen, müssen Abweichungen auftreten. Eine gute Übereinstimmung mit (22) ist eigentlich nur in homologen Reihen zu erwarten, und auch dort nur so lange, als die räumliche Anordnung jedem homologen Bauelement dieselbe Möglichkeit zur Solvatation bieten kann und gleichzeitig der Rest der Molekel in jedem Glied der Reihe identisch bleibt. Gemeint sind also homologe Reihen im engeren Sinn, d. h. z. B. die Reihe der normalen Carbonsäuren, Alkohole, Ester, Amine, Aminosäuren usw.; ebenso Benzol, Toluol, Äthylbenzol, nicht aber Benzol, Toluol und Xylol [*56*]. Auch Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure usw. bilden nach dem obigen Kriterium keine

[1] Ist z. B. S_0 = Benzol und X = Cl, die substituierte Verbindung demnach Chlorbenzol, so ist die Grundgruppe S_0 = Benzol bzw. Phenyl. Benzol und Phenyl werden nicht voneinander unterschieden.

[2] Das Phasenverhältnis ϱ ist bei Papier- bzw. Dünnschicht-Chromatogrammen außer vom Fließmittel vom Papier bzw. von der Schicht abhängig. G heißt deshalb auch Papier-Konstante bzw. Schicht-Konstante [*56*].

homologe Reihe, denn es ändert sich nicht nur die Kettenlänge, sondern auch die gegenseitige Beeinflussung der Carboxylgruppen. Im Rahmen solcher Einschränkungen ist, wie oben erwähnt wurde[1], die nach (22) geforderte Additivität experimentell oft bestätigt worden. Bei systematischer Auswertung von (22) lassen sich empirische Konstanten ermitteln, deren Kenntnis die Berechnung von Rm- bzw. Rf-Werten ermöglicht. Reichl [*55*], Pardee [*46*] und Moore und Baker [*57*] fanden zwischen berechneten und gefundenen Rf-Werten sehr gute Übereinstimmung. Schauer und Bulirsch [*58–60*] schließlich bestimmten aus der Umkehrfunktion von (22) unter einigen praktischen Vorbehalten die Art und die Anzahl funktioneller Gruppen in unbekannten Verbindungen mit bekannten Rf-Werten.

Alle Konstanten in (22) sind vom verwendeten „chromatographischen System"[2] abhängig. Ein Wechsel des Systems ist also mit einer Änderung von Rm verbunden. Dieses Δ Rm kann bei isomeren bzw. epimeren Verbindungen verschieden sein. Macek [*61*] zeigte z. B. an Hand von 5 + 4 Beispielen, daß

$$\Delta\,\mathrm{Rm}_{\text{Formamid/Formamid-Ammoniumformiat; Papier}}\ \text{bei}$$

Reserpoiden der normalen Reihe 0,71–0,86, bei Reserpoiden der Iso-Reihe dagegen nur 0,38–0,48 beträgt und deshalb zur Konfigurationsbestimmung herangezogen werden kann (Epimerie am Kohlenstoffatom Nr. 3). Die relative Konstanz von Rm innerhalb einer sterischen Reihe entspricht durchaus der Konzeption von (22); sie ist um so eher zu erwarten, je ausgeprägter die Molekülgestalt durch die Epimerie beeinflußt wird.

Isomere, d. h. Verbindungen mit identischen Bauelementen, sind chromatographisch oft trennbar[3]. Dies ist kein Widerspruch zu (22), sondern ein Ausdruck unterschiedlicher, in (22) vernachlässigter Wechselwirkung mit der Umgebung. Theoretisch wird man dem erst dann Rechnung tragen können, wenn mehr über diese Wechselwirkung und die gegenseitige Beeinflussung gleicher, aber verschiedenartig angeordneter Bauelemente bekannt sein wird. Einem empirischen Studium dagegen steht das Problem heute schon offen; man kann (22) durch die Einführung von experimentell bestimmbaren Isomerie-Konstanten ergänzen und das vorliegende Material auf diese Weise vor allem einmal auf einen übersichtlichen Nenner bringen [*62*].

Die Beziehung (22) bietet schließlich die Möglichkeit, Schichtmaterialien oder Papiere verschiedener Qualität an Hand der Schicht- bzw. Papier-Konstanten zu eichen, Unterschiede gegebenenfalls rechnerisch zu eliminieren und auf diese Weise schließlich zu standardisierten Rf-Werten zu gelangen [*56, 63*].

c) Ausnahmen

Nun gibt es Fälle, wo die Beziehung (22) merkwürdigerweise nicht stimmt. Wie erwähnt, verändert sich Rm innerhalb einer homologen

[1] Fußnote [2] von S. 105.
[2] Vgl. Fußnote [2] S. 103.
[3] Beispiele in [*62*].

Reihe manchmal proportional zum Logarithmus der Anzahl homologer Bauelemente. Der Einfluß pro Bauelement nimmt also mit steigendem Molekulargewicht ab. Wir möchten die Ansicht zur Diskussion stellen, daß unter solchen Umständen weniger Verteilungschromatographie als Adsorptionschromatographie vorliegt und deshalb die Gültigkeit von (22) vielleicht zu Unrecht vorausgesetzt wird. Wir haben nämlich in unserem Laboratorium unter rund 20 untersuchten Beispielen bisher nur einen Fall gefunden, welcher der log-log-Beziehung folgte: es handelt sich um die Reihe der DNP-Amine ($C_1 - C_5$) auf Kieselgel G in Benzol als Fließmittel[1]. Andererseits konnten wir überall, wo aus chemischen Überlegungen eher auf Verteilungschromatographie zu schließen war, die Beziehung (22) bestätigen. Dies gelang aber erst, nachdem festgestellt worden war, daß auf Dünnschicht-Chromatogrammen sehr oft Fließmittelentmischung infolge von differenzierter Adsorption der einzelnen Fließmittel-Komponenten (Frontalanalyse) auftritt und der Rf-Wert gegebenenfalls auf eine andere als die vorderste Lösungsmittelfront zu beziehen ist. — Bei Berücksichtigung dieser Verhältnisse haben sich übrigens auch jene Beispiele, bei denen wir eine Ra-Beziehung gefunden zu haben glaubten [*62*], auf eine reine Rm-Beziehung nach (22) zurückführen lassen [*56*].

Bevor man somit an eine theoretische Behandlung von Rf-Werten denken darf, muß man sich unbedingt ein Bild über deren Zuverlässigkeit machen können. Namentlich bei älteren Literaturdaten dürfte dies meistens unmöglich sein. Es ist daher bei Schlußfolgerungen, die auf einer Interpretation von fremdem Versuchsmaterial beruhen[2], eine gewisse Vorsicht am Platze. Auf die Probleme bei der Rf-Wert-Bestimmung wollen wir im folgenden Abschnitt eingehender eintreten.

III. Besonderheiten der Dünnschicht-Chromatographie

Ein chromatographischer Prozeß kann dem Trennvorgang im Signerschen Trog nur dann entsprechen, wenn die Versuchsanordnung prinzipiell identisch ist. Bei der Dünnschicht-Chromatographie in ihrer üblichen Form ist diese Voraussetzung nicht erfüllt: die „Säule" enthält bei Versuchsbeginn noch kein Fließmittel, und es besteht die Möglichkeit zur Substanzausbreitung durch Quer-Diffusion. Dieser Unterschied darf bei theoretischen Erwägungen nicht übersehen werden. Dasselbe Problem stellt sich natürlich bei der Papier-Chromatographie. Die nachstehende Diskussion stützt sich deshalb auf Erfahrungen aus beiden Arbeitsgebieten. Neben Parallelen gibt es auch Unterschiede zwischen Dünnschicht- und Papier-Chromatographie. Wir werden auch sie kurz streifen und dann zum Abschluß auf eine praktisch wichtige Beziehung zwischen Dünnschicht-Chromatographie und einer neuen Art von Säulen-Chromatographie hinweisen.

[1] Horizontale Technik, „bedeckte Platte", vgl. [*64*].

[2] Vgl. z. B. Franc und Jokl [*43*]. Die Arbeit dieser Autoren verdient trotz dem genannten Zweifel sorgfältigste Beachtung.

1. Parallelen zur Papier-Chromatographie

a) Fließmittelbewegung, Fließmittelverteilung, Rf- und Rm-Werte

α) Einkomponentige Fließmittel

Im Kapitel über die Entwicklung eines Chromatogramms (Abschn. I, S. 98—99) ist bereits erwähnt worden, daß der zeitliche Verlauf des Fließmittel- und Substanztransportes auf Dünnschicht-, bzw. Papierchromatogrammen anders ist als im Signerschen Trog. Ursache ist die „trockene" Säule. Wir finden hier während der Entwicklung ein besonderes Zeitgesetz für die Bewegung der Fließmittelfront, längs der Laufstrecke eine variable Verteilung des Fließmittels und als Folge davon ungleichmäßige relative Wanderungsgeschwindigkeiten von chromatographierten Substanzen. Die letztere Feststellung bedeutet, daß die Rf-Werte sich während des Chromatographier-Prozesses verändern.

Wanderung der Fließmittelfront. Das Zeitgesetz für die Bewegung der Fließmittelfront hängt bei einem gegebenen chromatographischen System von der Chromatographiertechnik ab (aufsteigend, horizontal, absteigend). Auf Papieren gilt — im Falle von horizontaler und aufsteigender Chromatographie — zwischen der Wanderungsstrecke der Front z_f und der benötigten Zeit t nach einer kurzen Anlaufperiode eine relativ einfache Beziehung der Form

$$(z_f)^2 = a + b \cdot t, \text{ wobei a und b Konstanten sind } [14, 65—68].$$

Wir haben diese Beziehung auf Kieselgel bei aufsteigender und bei horizontaler Technik (bedeckte Platte) bestätigen können (vgl. Abb. 58a und b).

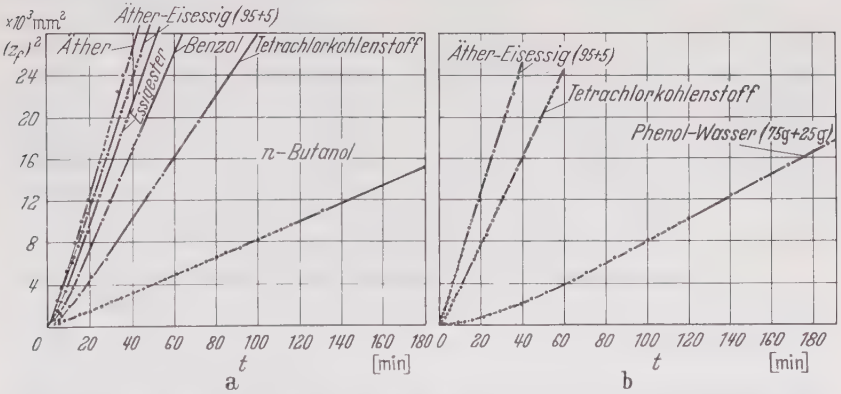

Abb. 58. Wanderungsgeschwindigkeiten von Fließmittelfronten bei 20° C in lufttrockenen Kieselgel G -Schichten bei horizontaler Technik (bedeckte Platte [64]), Fig. 58 a, und bei aufsteigender Technik (Desaga-Trennkammer, Kammersättigung), Fig. 58b. Die Verringerung der Fließgeschwindigkeit bei horizontaler Technik ist wahrscheinlich auf den bremsenden Effekt des als Flüssigkeitsbrücke dienenden Filterpapiers zurückzuführen

Für die Praxis folgt, daß Formeln, welche eine gleichförmige Bewegung der Fließmittelfront voraussetzen, bei den zur Zeit verwendeten Ausführungsformen der Dünnschicht-Chromatographie nicht zur Be-

stimmung der theoretischen Bodenzahl verwendbar sind. Die theoretische Bodenhöhe ist nicht konstant; sie nimmt mit zunehmender Laufstrecke zu. Dementsprechend ist die Trennwirkung des Prozesses am Anfang am größten. — Es sei in diesem Zusammenhang nochmals daran erinnert, daß auch die Fleckenverbreiterung während der Substanzwanderung proportional zu $\sqrt{t}$ erfolgt (vgl. Abschn. I, S. 103).

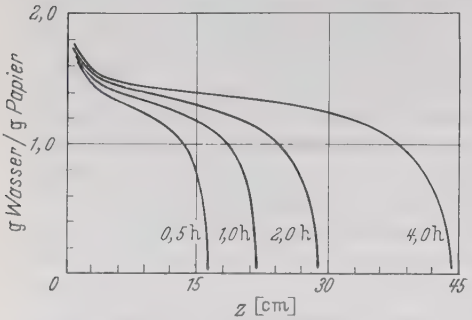

Abb. 59. Fließmittelverteilung (Profil) in Abhängigkeit von der Zeit und der Distanz z zwischen Startlinie (Eintauchspiegel) und Beobachtungspunkt (Wasser, WHATMAN 3 MM, nach GIDDINGS et al. [68])

Fließmittelprofil. Wie die Bewegung der Fließmittelfront, so ist auch die Verteilung des Fließmittels längs der Laufstrecke von der Chromatographier-Technik abhängig [67, 68]. GIDDINGS u. Mitarb. [68] benützen für diese Verteilung den Ausdruck „Fließmittelprofil". Sie haben einige Profile bei horizontalen[1] Papier-Chromatogrammen mit radialer und einseitiger Fließmittelausbreitung untersucht. Im vorliegenden Zusammenhang interessiert insbesondere die einseitige Ausbreitung, wobei sich das Fließmittel von einer Startlinie aus rechtwinklig zu dieser bewegt. Abb. 59 zeigt für einen solchen Fall die Situation zu verschiedenen Zeitpunkten. Interessant und wichtig ist nun, daß die im Laufe einer Chromatogramm-Entwicklung nacheinander auftretenden Profile sich auf ein gemeinsames, für das gegebene chromatographische System[2] charakteristisches Grundprofil reduzieren lassen. Man ersetzt hierzu die Distanzen z von Abb. 59 durch die reduzierten Distanzen z/z_f. Dabei bedeuten z Distanzen von der Startlinie (Eintauchspiegel) bis zu den Beobachtungspunkten, und z_f Distanzen vom Eintauchspiegel bis zur jeweiligen Fließmittelfront (Abb. 60).

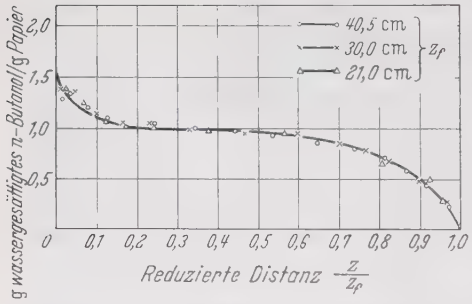

Abb. 60. Reduzierte Fließmittelverteilung (Grundprofil) nach GIDDINGS et al. [68] (wassergesättigtes n-Butanol, WHATMAN (3 MM)

Man sieht aus Abb. 60, daß es für jeden beobachteten Benetzungsgrad des Papiers eine Zone gibt, die zwar während der Entwicklung ihren Platz ändert, gleichzeitig aber ihre Lage relativ zur Front beibehält. Eine Substanz mit beliebig gegebenem Rf-Wert, die gleichzeitig mit dem Fließmittel von einer *gemeinsamen* Startlinie aus zu wandern beginnt,

[1] Bei auf- und absteigender Chromatographie sind die Verhältnisse völlig unübersichtlich (vgl. [68]).

[2] Vgl. Fußnote [2] auf S. 103.

wird also während der ganzen Chromatographier-Dauer das gleiche Phasenverhältnis ϱ vorfinden. Substanzen mit verschiedenen Rf-Werten treffen je nach der Form des Grundprofils auf verschiedene Phasenverhältnisse ϱ. Fallen die Startlinie des Fließmittels (Eintauchspiegel) und der Startpunkt der Substanzen *nicht zusammen* (übliche Ausführungsform der Papier- und Dünnschicht-Chromatographie), so ist der ϱ-Wert für eine gegebene Substanz während der Chromatographie nicht mehr konstant: je nach der Distanz *Eintauchspiegel-Startpunkt*, je nach der Form des Grundprofils und je nach Substanz steigt ϱ von 0 ausgehend schneller oder langsamer auf einen konstanten Endwert an.

Fließmittelgeschwindigkeit hinter der Front; wahrer und beobachteter Rf-Wert. Nun ändert sich längs des Grundprofils nicht nur das Phasenverhältnis ϱ, sondern auch – in Wechselwirkung mit ϱ – die örtliche Fließmittelgeschwindigkeit. Das Produkt beider, d. h. der Fließmitteldurchsatz durch einen Schnitt quer zur Laufstrecke, nimmt mit zunehmendem Wert von $z : z_f$ ab [*68*]. Das Phasenverhältnis ϱ und die Fließmittelgeschwindigkeit sind daher, auch wenn sie örtlich wie zeitlich gegensinnig verlaufen, nicht einfach umgekehrt proportional zueinander. Der konventionell gemessene Rf-Wert[1] ($= Rf_{beobachtet}$, abgekürzt Rf_{beob}) einer Substanz wird durch diesen Umstand in sehr komplizierter Weise beeinflußt. *Man findet, daß Rf_{beob} immer kleiner ist als der an Hand unseres Modells (Signerscher Apparat) definierte, der Beziehung (22) in Abschnitt II zugrunde gelegte „wahre" Rf-Wert.* Die Differenz beträgt ungefähr 10–20%.

Um dies zu verstehen, ist es notwendig, die vom Substanzfleck während seiner Wanderung zurückgelegten Teilstrecken ds zu betrachten; ihre Summe ist dann die vom Substanzflecken zurückgelegte Gesamtstrecke s, und es gilt

$$Rf_{beob} = \frac{\int ds}{z_f - s_0} \tag{23}$$

wobei s_0 die Distanz zwischen *Startlinie des Fließmittels* und *Startpunkt des Substanzflecks*, z_f die gesamte Laufstrecke des Fließmittels von seiner Startlinie bis zur Front bedeutet. — Nach Abschnitt I, S. 95, ist Rf definiert als das Verhältnis p zwischen zwei Strecken; dividieren wir beide Strecken durch die seit Versuchsbeginn verflossene Zeit, so ergibt sich Rf als Verhältnis p zweier Geschwindigkeiten. Ist nun dieses Geschwindigkeitsverhältnis während der Substanzwanderung nicht konstant, so entspricht die auf eine Teilstrecke ds bezogene Aussage,

$$Rf = \frac{\text{momentane Substanzgeschwindigkeit}}{\text{Fließmittelgeschwindigkeit am Ort des Substanzflecks}}$$

immer noch der genannten Definition von Rf. — Nach Abschnitt II, S. 104, gilt die Beziehung $Rf = \frac{K' \cdot \varrho}{1 + K' \cdot \varrho}$ [vgl. (16)]. Wir wollen sie wegen der Veränderlichkeit von ϱ in der Form $Rf_{int} = \frac{K' \cdot \varrho'}{1 + K' \cdot \varrho'}$ schreiben. Rf_{int} bezeichnet den im Moment der Beobachtung gültigen, durch K' und ϱ' definierten „inneren"[2] Rf-Wert. Offensichtlich sind nun Rf_{int} und der oben genannte, nach Abschnitt I definierte Rf-Wert identisch. Damit gilt auch

$$Rf_{int} = \frac{\text{momentane Substanzgeschwindigkeit}}{\text{Fließmittelgeschwindigkeit am Ort des Substanzflecks}} .$$

[1] Distanzverhältnis *Start-Fleckenmittelpunkt*: *Start-Fließmittelfront*.

[2] „inner" im Sinn des englischen Wortes "intrinsic".

Befindet sich die Substanz an einer Stelle z hinter der Front, ist u_z ihre Geschwindigkeit an der Stelle z und v_f die Fließmittelgeschwindigkeit an der Stelle z, so können wir schreiben:

$$u_z = v_z \cdot Rf_{int,\,z} \cdot \tag{24}$$

v_z ist von der Geschwindigkeit der Fließmittelfront v_f verschieden. Nach GIDDINGS gilt:

$$v_z = v_f \cdot \frac{A_z}{W_z}, \tag{25}$$

wobei $\frac{A}{W}$ einen örtlich veränderlichen Faktor darstellt; sein Zahlenwert ist immer kleiner als 1. Die Bedeutung von W ergibt sich aus Abb. 59 als örtliche Fließmittelbeladung. A verbindet als variabler Proportionalitätsfaktor den Fließmitteldurchsatz an irgend einer Stelle mit der Frontgeschwindigkeit v_f; der Fließmitteldurchsatz an der Stelle z ist also $A_z \cdot v_f$. GIDDINGS hat A für den Fall des reduzierten Profils nach Abb. 60 errechnet und die Größe $\frac{A}{W}$ für die Werte $\frac{z}{z_f} = 0$ bis 1 numerisch angegeben (vgl. Fig. 4 in GIDDINGS [*68*], oberste mit $c = 0$ indizierte Kurve). Durch Einsetzen von (25) in (24) folgt:

$$u_z = v_f \cdot \frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,\,z} \tag{26}$$

oder, durch Multiplikation mit dt

$$ds_z = \frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,\,z} \cdot dz_f \tag{27}$$

Die gesamte Wanderungsstrecke s entspricht also dem Integral

$$s = \int_{\substack{\text{Startpunkt}\\ \text{Substanzfleck}}}^{\text{Fließmittelfront}} \frac{A_z}{W_z} Rf_{int,\,z} \cdot dz_f \tag{28}$$

Die gesamte Laufstrecke des Fließmittels vom Startpunkt der Substanz bis zur Fließmittelfront ist

$$\int_{\substack{\text{Startpunkt}\\ \text{Substanzfleck}}}^{\text{Fließmittelfront}} dz_f = z_f - s_0$$

und es gilt jetzt nach (23)

$$Rf_{beob} = \frac{\displaystyle\int_{\substack{\text{Startpunkt}\\ \text{Substanzfleck}}}^{\text{Fließmittelfront}} \frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,z} \cdot dz_f}{z_f - s_0} \tag{29}$$[1]

[1] Der Integrand $\frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,\,z}$ ist, wie man durch algebraische Umwandlung leicht zeigen kann, identisch mit einer von GIDDINGS verwendeten und für den Fall des reduzierten Profils nach Abb. 60 für alle Werte von $z : z_f$ und verschiedene Werte von c numerisch berechneten Größe $\frac{A_z}{W_z + c}$ (vgl. die graphische Darstellung in Fig. 4 bei GIDDINGS [*68*]). Der Parameter c ist die in jener Arbeit benützte Verteilungsfunktion; er entspricht dem Verhältnis

$$\frac{\text{Gramm stationäre Phase pro Gramm Trägermaterial}}{\text{Verteilungskoeffizient } K'}.$$

Es ist wichtig, sich die Bedeutung des Integranden von (29) zu vergegenwärtigen. Mit der Frontverschiebung dz_f erfolgt an der Stelle z eine Fließmittelverschiebung um

$$\frac{A_z}{W_z} \cdot dz_f \quad [\text{vgl. (25)}]$$

und folglich eine Verschiebung des Substanzflecks um

$$Rf_{int,z} \cdot \frac{A_z}{W_z} \cdot dz_f \quad [\text{vgl. (27)}].$$

Der Integrand entspricht ferner gemäß (26) dem Verhältnis

$$\frac{u_z}{v_f} = \frac{\text{momentane Substanzgeschwindigkeit}}{\text{Frontgeschwindigkeit}}.$$

Sein Zahlenwert ist — abgesehen von konstanten Größen wie K′ und den Kennwerten des angewandten chromatographischen Systems[1] — durch die Beschaffenheit des Profils an der Stelle z gegeben.

Im Augenblick, da die wandernde Fließmittelfront auf den Substanzfleck am Startpunkt trifft, ist wegen $\varrho'_z = 0$ und $Rf_{int,z} = 0$ die Substanzgeschwindigkeit $u_z = 0$. Unmittelbar darauf kommt die Substanz in Bewegung ($\varrho'_z > 0$, $Rf_{int,z} > 0$). Mit $u_z > 0$ wird auch $u_z/v_f > 0$. Verfolgen wir nun bei weiterhin zunehmendem z_f den Zahlenwert von u_z/v_f, so finden wir, daß sein anfänglicher Anstieg allmählich abklingt. Es wird schließlich ein Endwert erreicht, der auch bei beliebig fortgesetzter Fließmittelausbreitung konstant bleibt. Dies hat folgenden Grund.

Mit z_f als Einheitsstrecke ändert sich unser Längenmaß während der Fließmittelausbreitung in gleicher Weise wie ein aus Gummi gefertigter Maßstab der Länge z_f beim Dehnen mit der Dehnungsgeschwindigkeit v_f. Eine an einer beliebigen Stelle angebrachte Marke ändert dabei ihre absolute, nicht aber ihre relative Lage. Ist letztere durch ein gegebenes Verhältnis z/z_f definiert, so beträgt die Verschiebungsgeschwindigkeit der markierten Stelle $\frac{z}{z_f} \cdot v_f$. Ein an der gleichen Stelle befindlicher Substanzfleck wandert nach (26) mit der Geschwindigkeit

$$Rf_{int,z} \cdot \frac{A_z}{W_z} \cdot v_f. \quad \text{Ist nun} \quad \frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,z} < \frac{z}{z_f},$$

so ist die absolute Bewegung des Substanzfleckens verschieden von der absoluten Bewegung der ins Auge gefaßten Marke (Stelle z/z_f im reduzierten Profil). Der Fleck wandert langsamer und verschiebt sich deshalb an eine Stelle mit einem kleineren Wert von z/z_f. Ist dieser kleinere Wert immer noch vom nunmehr gültigen neuen Betrag $\frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,z}$ verschieden, so ergibt sich eine weitere Verschiebung; dies setzt sich fort unter Anstrebung des Zustandes

$$\left(Rf_{int,z} \cdot \frac{A_z}{W_z}\right)_{\text{Endwert}} = \left(\frac{z}{z_f}\right)_{\text{Endwert}}.$$

Eine an der Stelle $(z/z_f)_{\text{Endwert}}$ angebrachte Marke verschiebt sich bei weiterer Fließmittelausbreitung von jetzt an mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Substanzfleck. Dieser ändert seine Lage im reduzierten Profil nicht mehr. Die durch $(z/z_f)_{\text{Endwert}}$ bestimmte Profilbeschaffenheit in der Umgebung des Substanzflecks bleibt konstant, ebenso der Integrand von (29) und mit ihm das Geschwindigkeitsverhältnis u_z/v_f. Es ist also ein stationärer Zustand erreicht worden.

Betrachten wir jetzt nochmals Gleichung (29). Mit der Zunahme des Integranden von Null bis $\left(\frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,z}\right)_{\text{Endwert}}$ ergibt sich

$$\lim_{z_f \to \infty} Rf_{beob} = \left(\frac{A_z}{W_z} \cdot Rf_{int,z}\right)_{\text{Endwert}} \tag{30}$$

[1] Vgl. Fußnote 2 auf S. 103.

Dieser Grenzwert wird, wie GIDDINGS gezeigt hat, unter den in der Praxis üblichen Chromatographier-Bedingungen (Distanz *Eintauchspiegel-Start* ≪ Distanz *Start-Fließmittelfront)* meistens nahezu erreicht. Läßt sich $\left(\frac{A_z}{W_z}\right)_{\text{Endwert}}$ numerisch bestimmen, so ergibt sich der stationäre wahre Rf-Wert zu

$$Rf_{wahr} \equiv Rf_{int,\,Endwert} = \frac{\lim Rf_{beob}}{\left(\frac{A_z}{W_z}\right)_{Endwert}}, \tag{31}$$

oder einfacher:

$$Rf_{wahr} \approx \frac{Rf_{beob}}{\left(\frac{A}{W}\right)_{Rf_{beob}}}, \tag{32}$$

wobei

$$\left(\frac{A}{W}\right)_{Rf_{beob}} \approx \left(\frac{A_z}{W_z}\right)_{Endwert}.$$

Es ist natürlich jeder Wert von $Rf_{int,z}$ ein „wahrer" Rf-Wert. Die Größe $Rf_{int,Endwert}$ verdient aber bei der Definition (31) von Rf_{wahr} den Vorzug, weil sie sich auf ein Phasenverhältnis ϱ bezieht, das für alle Substanzen, die stationär im mittleren Profilbereich (Abb. 60) wandern, wenigstens näherungsweise gleich ist. Kann $\left(\frac{A_z}{W_z}\right)_{Endwert}$ im erwähnten Bereich bestimmt werden[1], so bildet Rf_{wahr} nach (31) eine Basis, auf der sich das chromatographische Verhalten sehr vieler Substanzen in guter Näherung quantitativ vergleichen läßt. Wir werden unten auf eine der Gleichung (31) bzw. (32) ähnliche empirische Beziehung stoßen.

Für direkte Vergleichszwecke ist die Differenz zwischen Rf_{beob} und dem wahren Rf-Wert ohne Bedeutung. Will man aber Zusammenhänge zwischen chromatographischem Verhalten und chemischer Konstitution erfassen (vgl. Abschnitt II), so sind die beobachteten Rf-Werte kein sicheres Maß für den Verteilungskoeffizienten K′ und das Phasenverhältnis ϱ und daher nur mit Vorsicht in Gleichung (16) einzusetzen (vgl. unten). Es erscheint deshalb erstaunlich, daß papierchromatographisch beobachtete Rf-Werte (Rf_{beob}) von Gliedern homologer Reihen in vielen Fällen der Martinschen Rm-Beziehung genügen[2]. Nach unseren Feststellungen gilt das auch für Rf_{beob} von Aminosäuren auf Dünnschicht-Chromatogrammen (vgl. Abb. 61) [*56*].

Wie erklärt sich diese Diskrepanz zwischen Theorie und Praxis? Einen ersten Hinweis findet man beim Vergleich der Rf_{beob}, die im Sinne der Gleichung (22) brauchbare Rm-Werte liefern, mit jenen, die der Beziehung (22) nicht genügen. Es gilt die Regel, daß bei Anwendung von (22) $0{,}1 < Rf_{beob} < 0{,}7$ sein soll [*69*]. Nun ist dies gerade ein Bereich, in welchem das reduzierte Fließmittelprofil evtl. einigermaßen horizontal verläuft (vgl. z. B. Abb. 60). Vorläufige eigene Untersuchungen scheinen zu bestätigen, daß sich ähnliche Profile auf Kieselgel-Schichten sowohl bei horizontaler wie auch bei vertikaler Technik ausbilden [*56*, *70*]. Substanzen, die im „horizontalen" Profilbereich wandern, treffen also alle

[1] In dem von GIDDINGS numerisch behandelten Beispiel (Abb. 60) bewegt sich zwischen $Rf_{beob} = 0{,}2$ und $Rf_{beob} = 0{,}7$ die Größe $\left(\frac{A}{W}\right)_{Rf_{beob}}$ zwischen 0,85 und 0,9; sie ist also nahezu konstant.

[2] Vgl. Fußnote [2] auf S. 105.

ungefähr auf das gleiche Phasenverhältnis ϱ. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit von (22) erfüllt. — Einen zweiten Hinweis gibt die folgende Beobachtung. Verhindert man auf einer Kieselgelschicht nach einer Laufstrecke von 10—15 cm durch Anbringen eines Trennstriches das weitere Vordringen der Fließmittelfront, so hört der Fließmittelstrom nicht sofort auf. Das Profil läßt sich zwar auch nach 24 Std. nicht zum Verschwinden bringen (aufsteigende Technik); es wird aber beträchtlich ausgeebnet. Hierbei nehmen alle Rf_{beob} um einen gleichen Faktor (ca. 1,1) zu. Sie streben also einem Endwert entgegen [*72*]. Der ideale Endwert wäre bei völligem Verschwinden des Profils erreicht und würde offensichtlich dem wahren nach (16) definierten Rf-Wert entsprechen (ϱ überall gleich).

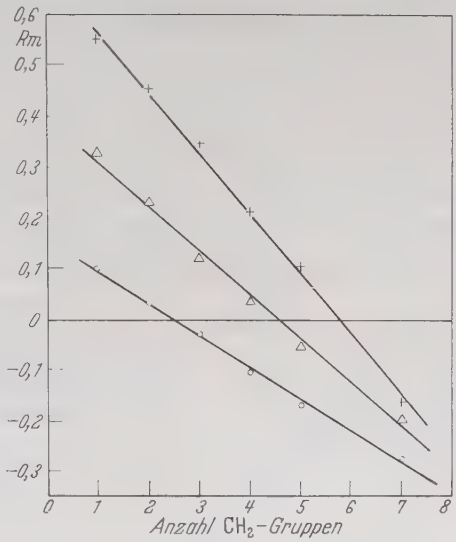

Abb. 61. Lineare Beziehung zwischen Rm und Anzahl CH_2-Gruppen in der Reihe der α-Aminosäuren von C_2 bis C_8. Die Regressionsgeraden sind berechnet [*56*].

○ Methanol/Wasser
△ Äthanol/Wasser
+ n-Propanol/Wasser
} 70 + 30; Kieselgel G, aufsteigend (zur Technik vgl. [*71*])

Jeder Punkt entspricht dem Mittel aus 18 Beobachtungen: Die 6 Aminosäuren wurden je zwei Mal auf einer Platte chromatographiert (Reihenfolge beliebig), und der Versuch wurde 9mal wiederholt. Zusatz von 2, 4, 8 oder 16% Eisessig hat keinen Einfluß auf die Linearität, verändert aber Neigung und Lage der Geraden

Beziehungen von Rm_{beob} zu Rm′ und Rm; Additivität von Rm_{beob}. Wenn wir nun annehmen wollen, daß im Rf-Bereich zwischen 0,1 und 0,7 beobachtete Rf-Werte, insbesondere aber die aus vielen Einzelbeobachtungen Rf_{beob} gebildeten Mittelwerte $\overline{Rf}_{beob}$ der Beziehung

$$\overline{Rf}_{beob} \cdot \xi = Rf_{wahr} \quad (33)^1$$

genügen und wenn wir für den Faktor ξ einen konstanten Wert zwischen 1,1 und 1,2 einsetzen, so läßt sich zeigen, daß

$$Rm_{beob} = \log\left(\frac{1}{\overline{Rf}_{beob}} - 1\right) \text{ eine Schätzung von}$$

$$Rm' = \log\xi\left(\frac{1}{Rf_{wahr}} - 1\right)$$

liefert, welche die Additivität von Rm ganz ordentlich wiedergibt und deshalb in vielen Fällen praktisch brauchbar ist [*56*].

[1] Man beachte die formale Übereinstimmung mit der theoretisch begründeten Beziehung (32). Das empirische ξ entspricht auch zahlenmäßig dem dort gefundenen, im mittleren Profilbereich nahezu konstanten Faktor $1\Big/\left(\frac{A}{W}\right)_{Rf_{beob}}$.

Aus (21a) erhält man unter Berücksichtigung von (33) und durch beidseitige Addition von $\log \xi$:

$$\log \xi \left(\frac{1}{\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}} \cdot \xi} - 1 \right) = \frac{\Delta \mathrm{F}_0}{2{,}3\ \mathrm{RT}} + \frac{\mathrm{m} \Delta \mathrm{F}_\mathrm{X}}{2{,}3\ \mathrm{RT}} + \cdots + \log \frac{\xi}{\varrho}, \qquad (21\,\mathrm{b})$$

wobei

$$\log \xi \left(\frac{1}{\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}} \cdot \xi} - 1 \right) = \log \left(\frac{1}{\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}} - \xi \right) \qquad (34)$$

und

$$\log \left(\frac{1}{\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}} - \xi \right) = \log \left(\frac{1}{\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}} - 1 \right) + \delta \qquad (35)$$

bzw.

$$\mathrm{Rm}' = \mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}} + \delta, \quad \text{mit} \quad \mathrm{Rm}' = \mathrm{Rm} + \log \xi. \qquad (\text{vgl. } 22)$$

δ ist der Fehler, den wir machen, wenn wir den Ausdruck auf der linken Seite von (21b) durch die leicht berechenbare Größe $\log \left(\frac{1}{\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}} - 1 \right)$ ersetzen. Der Wert von δ, eine Funktion von ξ und $\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}$, ist für den ungünstigen Fall $\xi = 1{,}2$ der Differenz von Rm′ und $\mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}}$ in Abb. 62 zu entnehmen. Rm′ und $\mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}}$ sind als Bänder dargestellt, um der Streuung bei der experimentellen Bestimmung von Rf-Werten Rechnung zu tragen. Die Standardabweichung von $\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}$ beträgt auf Dünnschicht- und Papier-Chromatogrammen im Mittel $s_{\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}} \approx \approx 0{,}0037$ (18 Einzelwerte); eine Mittelwert-Stichprobe fällt danach mit sehr großer Wahrscheinlichkeit in den Bereich $\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}} \pm 0{,}011$ [71].

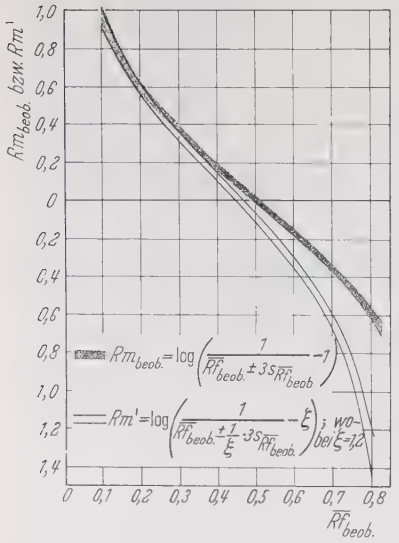

Abb. 62. Vergleich von $\mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}}$ mit dem „theoretischen" Wert Rm′ bei verschiedenen Werten von $\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}}$ unter Berücksichtigung der Meßfehler. Vgl. Text und Gleichungen (21b), (34), (35). [56]

Wie man sieht, stimmen Rm′ und $\mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}}$ bei $0{,}1 < \overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}} < 0{,}3$ innerhalb der Versuchsfehler überein; δ nimmt dann bis $\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}} = 0{,}6$ gleichmäßig zu, steigt aber bei $\overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}} \geqq 0{,}7$ stark an. Im Gebiet $0{,}1 < \overline{\mathrm{Rf}}_{\mathrm{beob}} < 0{,}6$ stellt also $\mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}}$ tatsächlich eine Näherung für Rm′ dar. Ihre Brauchbarkeit ergibt sich aus Abb. 63; dort sind die Werte vom mittleren Beispiel aus Abb. 61 nochmals in etwas anderem Maßstab den entsprechenden Werten Rm′ ($\xi = 1{,}2$) gegenüber gestellt, und für alle Daten ist die Schwankungsbreite $\pm 3\ s_{\overline{\mathrm{Rm}}}$ eingezeichnet. Die Näherung von Rm′ durch $\mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}}$ ist ordentlich in bezug auf die Additivität und gut in bezug auf die Steigung der Regressionsgeraden; die Vertikal-Verschiebung δ ist belanglos. Unsere Überlegung zeigt also, daß $\mathrm{Rm}_{\mathrm{beob}}$ im Rahmen der experimentell gewünschten Genauigkeit für mittlere Rf-Werte additiv ist und Rm′ bzw. Rm ersetzen kann; sie bestätigt damit den entsprechenden empirischen Befund der Praxis.

Man könnte beim Vergleich von Rm_{beob} mit Rm' in Abb. 63 daran denken, immer $\log\left(\frac{1}{Rf_{beob}} - 1\right)$ durch $\log\left(\frac{1}{Rf_{beob}} - \xi\right)$ zu ersetzen, das jeweils beste ξ (beste Linearität) zu ermitteln und so maximalen Nutzen aus der Beziehung (22) bzw. (21 b) zu ziehen. Wir halten dies im Hinblick auf die Problematik unserer Annahmen (horizontales Profil, $Rf_{beob} \cdot \xi = Rf_{wahr}$) für abwegig. Die vorstehende Untersuchung verfolgte den alleinigen Zweck, die Rm-Wert-Empirie des Praktikers gegen die Zweifel der strengen Theorie zu verteidigen. Man wird dünnschicht-chromatographisch in der Ausnützung der Martinschen Beziehung (22) kaum soweit gelangen, wie gas-chromatographisch;

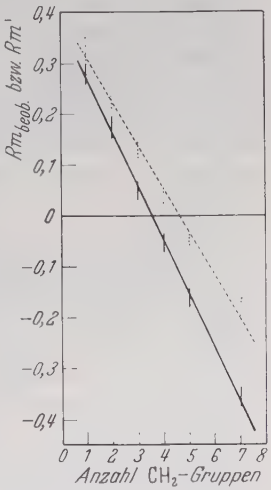

Abb. 63. Vergleich der berechneten Regressionsgeraden durch Rm_{beob} mit der visuell geschätzten Regressionsgeraden durch Rm' für die homologe Reihe der α-Aminosäuren von C_2 bis C_8. Experimentelle Daten aus Abb. 61, Fließmittel Äthanol/Wasser. Rm_{beob} punktiert; Rm' ausgezogen. [56]

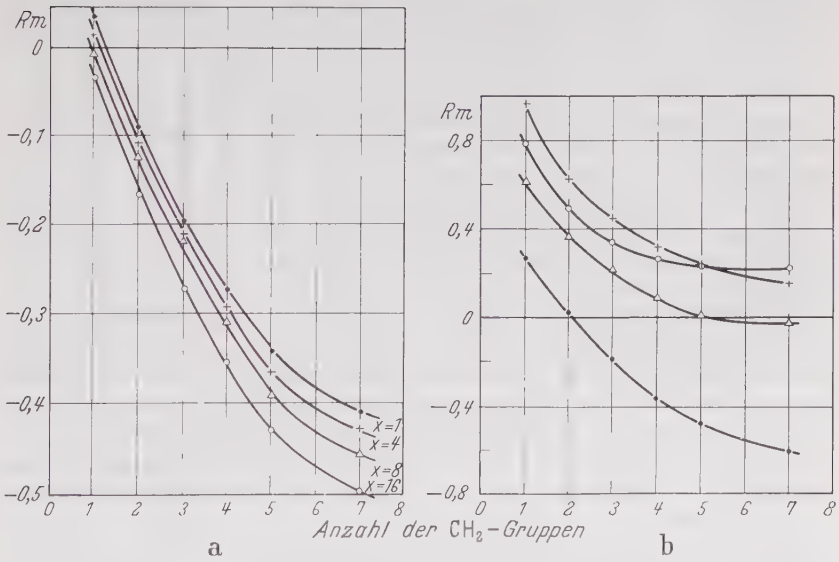

Abb. 64. Rm_{beob} ist nicht additiv, weil Rf_{beob} trotz Fließmittelentmischung konventionell auf die vorderste Fließmittelfront bezogen wurde [56, 70].

a) Homologe Reihe der α-Aminosäuren (Glycin bis α-Aminocaprylsäure) in Methanol/Wasser/Ammoniak 34% (70 + 30 + x). Kieselgel G, aufsteigende Technik [71].

b) Homologe Reihe der N-2,4-Dinitrophenyl-aminosäuren (Glycin bis α-Aminocaprylsäure) in 4 verschiedenen, mehrkomponentigen Fließmitteln:

· : Chloroform/Essigester/Eisessig (80 + 20 + 1),
○ : Chloroform/Methanol/Eisessig (95 + 5 + 1),
△ : Toluol/Eisessig (90 + 10),
● : Äther/Eisessig (95 + 5).

} Kieselgel G, horizontale Technik (bedeckte Platte) [64] vgl. auch [71]

es wäre aber falsch, aus Perfektionismus auf die Möglichkeiten zu verzichten, die sich aus der effektiven Additivität von Rm_{beob} ergeben.

Diese Additivität findet man unter Umständen auch in solchen Fällen, wo sie gar nicht zu bestehen scheint. Bei den Beispielen etwa in Abb. 64a und 64b liegen die Werte von Rm_{beob} von Gliedern homologer Reihen eindeutig nicht auf Geraden. Ursache ist indessen nicht ein Versagen der Theorie, sondern die Nichtberücksichtigung einer Störung, die auf chromatographischer Entmischung (Frontal-Analyse) des verwendeten Fließmittels beruht. Die konventionell gemessenen Rf-Werte (Rf_{beob}) genügen hier auch näherungsweise nicht mehr der Annahme

$$Rf_{wahr} = 1{,}2 \cdot Rf_{beob}$$

[vgl. (33)].

β) Mehrkomponentige Fließmittel; chromatographische Fließmittelentmischung

Aus mehreren Komponenten bestehende Fließmittel erleiden beim Eindringen in ein trockenes Adsorbens (aktive Dünnschicht oder gefüllte Chromatographiersäule) eine teilweise Entmischung. Diese Erscheinung ist wohlbekannt[1]; ein entsprechender Vorgang bildet die Basis einer speziellen chromatographischen Analysier-Technik, die auf TISELIUS zurückgeht und den Namen „Frontal-Analyse" erhalten hat [*75–78*].

Mehrere Fließmittelfronten. Die Entmischung beruht darauf, daß die Komponenten nach Maßgabe ihrer Adsorptions-Koeffizienten und Konzentrationen vom vordringenden Fließmittel allmählich an das Adsorbens abgegeben werden. Die Front ändert also ihre Zusammensetzung. Nach einiger Zeit – evtl. sehr bald – verschwindet eine erste Komponente ganz (hinterste Front), später eine zweite (zweithinterste Front), usw., bis schließlich nurmehr eine letzte Komponente übrig bleibt; diese wandert unverändert weiter (vorderste Front). Aus dem Fließmittelbehälter strömt ununterbrochen frisches Fließmittel nach. Vom Eintauchspiegel bis in die Nähe der hintersten Front, die natürlich ihrerseits auch wandert, steht das benetzte Adsorbens im Gleichgewicht mit dem Fließmittel der ursprünglichen Zusammensetzung. Es folgt bis zur zweithintersten Front eine Zone, die sich mit einem um eine Komponente ärmeren Fließmittelgemisch im Gleichgewicht befindet. Dasselbe gilt für die nächstfolgende Zone, und so fort. Ein Fließmittel aus n Komponenten bildet also in der Regel längs seiner Laufstrecke n verschiedene Zonen, die durch (n – 1) Fronten voneinander getrennt sind. Wir bezeichnen diese, von vorne beginnend, als α-, β-, γ-, ... ω-Front. Sind ${}^{\alpha}z_f$ (= z_f), ${}^{\beta}z_f$, ${}^{\gamma}z_f$ usw. die von den betreffenden Fronten bis zum Zeitpunkt der Beobachtung zurückgelegten Strecken und $\frac{d\,{}^{\alpha}z_f}{dt}$, $\frac{d\,{}^{\beta}z_f}{dt}$ usw. ihre Wanderungsgeschwindigkeiten, so kann man vereinfachend schreiben

$$\frac{d\,{}^{\beta}z_f}{dt} = k_{\beta} \cdot \frac{d\,{}^{\alpha}z_f}{dt} \quad \text{bzw.} \quad {}^{\beta}z_f = k_{\beta} \cdot {}^{\alpha}z_f$$

$$\frac{d\,{}^{\gamma}z_f}{dt} = k_{\gamma} \cdot \frac{d\,{}^{\alpha}z_f}{dt} \quad \text{bzw.} \quad {}^{\gamma}z_f = k_{\gamma} \cdot {}^{\alpha}z_f \quad \text{usw.}$$

[1] Vgl. dazu [*73*], [*74*].

k_β, $k_\gamma \ldots k_\omega$ sind also Verzögerungsfaktoren, die in Verbindung mit der Wanderungsgeschwindigkeit der α-Front die Geschwindigkeit der übrigen Fronten festlegen.

Ein Fließmittel aus zwei Komponenten, deren Wechselwirkung gering ist, kann als ideale Lösung der einen in der anderen Komponente aufgefaßt werden. Die Zusammensetzung wird dann zweckmäßig durch die Konzentration c_M in Mol-Prozenten angegeben. Die Beziehung zwischen der Konzentration c_M der (stärker) adsorbierten Komponente, ihrem Adsorptionskoeffizienten und dem Faktor k_β läßt sich aus der Freundlichschen Adsorptionsisotherme herleiten [*70*] und lautet:

$$\log\left(\frac{1}{k_\beta} - 1\right) = \varkappa - \zeta \cdot \log c_M \qquad (36)$$

wobei $\varkappa$ sowie ζ Konstanten sind; $\varkappa$ enthält den Freundlichschen Adsorptionskoeffizienten und das Phasenverhältnis. In den Systemen Benzol/Pyridin (Konzentrationsbereich 1—42 Molprozent Pyridin) und Toluol/Eisessig (Konzentrationsbereich 2—32 Molprozent Eisessig) haben wir (36) experimentell bestätigen können [*70*]. Bei Verwendung horizontaler, 0,3 mm dicker, lufttrockener (rel. Luftfeuchtigkeit 40%) Schichten von Kieselgel G ergaben sich für die Konstanten bei 20° C die folgenden Werte:

	$\varkappa$	ζ
Benzol/Pyridin	0,65	0,84
Toluol/Eisessig	0,91	0,82

Bei $c_M = 5$ Molprozent betrug $k_\beta = 0{,}32$ (Toluol/Eisessig), bzw. 0,47 (Benzol/Pyridin)! Es kann somit eine Fließmittelkomponente trotz kleinen prozentualen Anteils bei geeignetem Verhältnis der Polaritäten an einer β-Front mit hohem k_β-Wert beteiligt sein. Unterscheiden sich die Komponenten hinsichtlich der Polaritäten weniger stark als in den oben genannten Beispielen — etwa in einem Fließmittel aus Alkohol/Wasser —, so werden die k_β-Werte noch wesentlich größer.

Die durch Entmischung gebildeten Fronten sind nur in wenigen Fällen direkt sichtbar (Abb. 65), können aber an Hand des nun zu besprechenden chromatographischen Verhaltens geeigneter Substanzen und Substanzgemische leicht erkannt werden.

Das Fließmittel Chloroform/Methanol/Eisessig $(95 + 5 + 1)$[1] bildet auf Kieselgel eine α-, eine β- und eine γ-Front. Dementsprechend gibt es auf Chromatogrammen in diesem Fließmittel eine α-Zone ($CHCl_3$), eine β-Zone ($CHCl_3/CH_3OH$) und eine γ-Zone [$CHCl_3/CH_3OH/CH_3COOH$ $(95 + 5 + 1)$[1]]. Die von einer Substanz beim Chromatographieren zurückgelegte Strecke hängt nun davon ab, mit welcher Zone sie zu wandern beginnt, wie rasch und wie lange sie mit dieser Zone wandert, und ob sie evtl. während ihrer Wanderung von einer oder mehreren Zonen eingeholt wird. Abb. 65 gibt einige Beispiele. Bei der gewählten Anordnung der Startpunkte[2] und der gewählten Zusammensetzung der chromatographierten Substanzgemische kommen die Folgen der Fließmittelentmischung besonders gut zum Ausdruck.

Die polaren Substanzen (Dinitrophenol, DNP-Aminosäuren) kommen praktisch erst in Bewegung, wenn die γ-Front die jeweiligen Startpunkte überschreitet. Sie wandern also fast ausschließlich in der γ-Zone; ihre Rf_{beob}-Werte sind deshalb vernünftigerweise auf die Strecke *jeweiliger*

[1] Es sei daran erinnert, daß es sich — falls nichts vermerkt ist — immer um Volumteile (ml) handelt. Gewichtsteile werden durch g (Gramm) gekennzeichnet.
[2] Vgl. dazu [*73*], [*74*].

Startpunkt-γ-Front zu beziehen (Bezugsstrecke). Wir wollen solche Rf-Werte als $^{\gamma}Rf_{beob}$ bezeichnen. Liegen nun die Startpunkte auf einer schrägen Geraden (schräge Startlinie), so müssen auch die für jede Substanz durch das Produkt $^{\gamma}Rf_{beob} \cdot$ *Bezugsstrecke* festgelegten Endpunkte der Wanderungsstrecken auf einer schrägen Geraden (Verbindungsgerade) liegen[1]. Im Schnittpunkt zwischen schräger Startlinie und Verbindungsgerade wird die Wanderungsstrecke Null. Dieser Punkt muß also an

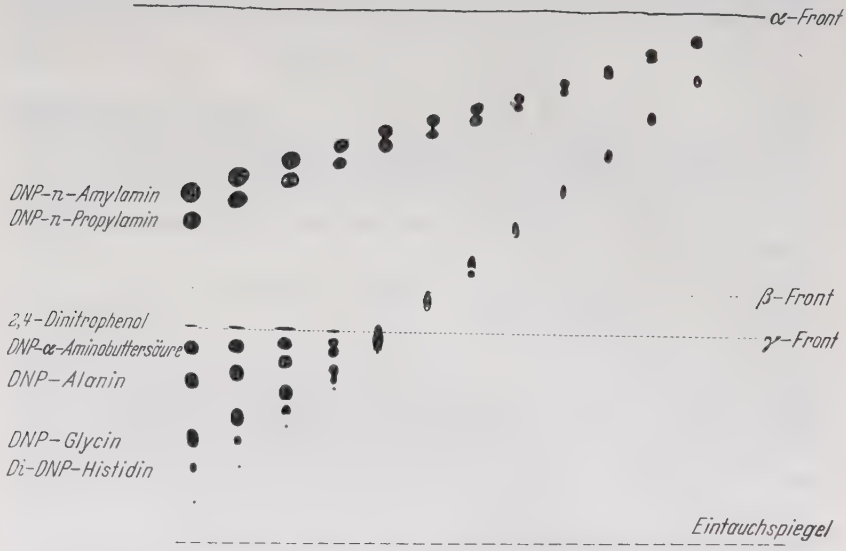

Abb. 65. Fließmittelentmischung und deren Nachweis[1] bei horizontaler Dünnschicht-Chromatographie (bedeckte Platte [*64*]) eines Gemisches von 2,4-Dinitrophenol und einigen 2,4-Dinitrophenyl- (DNP-) Verbindungen in Chloroform/Methanol/Eisessig (95 + 5 + 1) [*70*]. Das Substanzgemisch wurde mehrmals, und zwar in zunehmenden Abständen vom Eintauchspiegel, aufgetragen. Die Startpunkte liegen also auf einer Geraden, die von links unten nach rechts oben verläuft. α-, β- und γ-Front sind bei Beleuchtung mit UV-Licht direkt sichtbar. Die durch die Fronten getrennten Zonen weisen verschiedene Fließmittelzusammensetzung auf: reines Chloroform zwischen α- und β-Front (α-Zone), Chloroform/Methanol zwischen β- und γ-Front (β-Zone), Chloroform/Methanol/Eisessig zwischen γ-Front und Eintauchspiegel (γ-Zone)

[1] vgl. dazu [*73*], [*74*].

der Front der γ-Zone liegen; er bestimmt die Lage der γ-Front. In der Tat geht in Abb. 65 die γ-Front durch den angenähert[2] gemeinsamen Schnittpunkt von sechs Geraden: Schräge Startlinie, Verbindungsgerade der Flecken von DNP-Histidin, Verbindungsgerade der Flecken von DNP-Glycin usw.

Die weniger polaren Substanzen (DNP-Amine) kommen schon in Bewegung, wenn die α-Front die Startpunkte überschreitet. Da sich diese Flecken ausschließlich in der α-Zone bewegen, konvergieren die beiden zugehörigen Verbindungsgeraden mit guter Näherung im Schnitt-

[1] Voraussetzung ist, daß $^{\gamma}Rf_{beob}$ nicht merklich von der Distanz *Eintauchspiegel-Start* abhängt; sie ist weitgehend erfüllt (vgl. S. 124).

[2] Die Güte der Näherung hängt unter anderem davon ab, wie scharf die Front definiert ist. Maßgebend ist also die Steilheit des Konzentrationsgradienten beim Übergang von der einen Zone zur andern.

punkt zwischen schräger Startlinie und α-Front (Abb. 65). Hier ist es erlaubt, bei der Rf-Wert-Messung in konventioneller Weise die Distanz *Startpunkt-α-Front* als Bezugsstrecke zu benützen. Wir nennen einen solchen Rf-Wert ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ und behalten diese Bezeichnung auch dann bei, wenn die Distanz zur α-Front zu Unrecht als Bezugsstrecke gewählt wird. — Das effektive Fließmittel in der α-Zone des Chromatogramms nach Abb. 65 ist reines Chloroform. Dies läßt sich leicht bestätigen, indem man DNP-Amylamin und DNP-Propylamin mit reinem Chloroform als Fließmittel chromatographiert: die Werte von Rf_{beob} sind identisch mit den nach obigem Verfahren erhaltenen Werten von ${}^{\alpha}Rf_{beob}$.

Die β-Front in Abb. 65 spielt keine Rolle, weil alle im Substanzgemisch enthaltenen Verbindungen entweder vor oder nach dem Bereich der β-Zone wandern. Der Startpunkt innerhalb dieser Zone wird von der γ-Front nicht erreicht; die polaren Verbindungen bleiben deshalb einfach sitzen. Dasselbe gilt für die polaren Verbindungen auf den Startpunkten zwischen β- und α-Front.

Aus dem bisherigen folgt, daß die konventionelle Rf-Wert-Messung mit der Distanz *Startpunkt-α-Front* als Bezugsstrecke zu physikalisch sinnlosen Rf-Werten führen kann. Es ist falsch, die Wanderung einer Substanz auf die α-Front zu beziehen und ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ anzugeben, wenn die Substanz mit einer anderen als der α-Zone wandert[1]. Die korrekte Bezugsstrecke für die Rf-Wert-Messung ist die Distanz *Startpunkt-β-Front* oder *Startpunkt-γ-Front*, wenn die Substanz in der β- oder in der γ-Zone wandert. Voraussetzung für die Brauchbarkeit derart gemessener Rf-Werte — wir bezeichnen sie wie gesagt als ${}^{\beta}Rf_{beob}$ bzw. ${}^{\gamma}Rf_{beob}$ — ist aber, daß sich die Substanzen während der ganzen Chromatographierdauer praktisch ausschließlich in der betreffenden Zone bewegt haben.

Scharfe Fronten[2] bilden sich vor allem aus, wenn der Konzentrations-Ausgleich auf dem Weg über die Dampfphase[3] mehr oder weniger dahinfällt. Besonders günstig ist in dieser Beziehung die bedeckte Platte; sie ist deshalb bei dem in Abb. 65 dargestellten Versuch verwendet worden. Arbeitet man aufsteigend in der Trennkammer, so verwischen sich die Fronten um so mehr, je voluminöser der Gasraum ist. Mit dem Letzteren nimmt natürlich die den Konzentrationsausgleich begünstigende Fließmittel-Reserve in der Dampfphase zu. Bei großer Dampf-Reserve ist nur noch die Fließmittelzusammensetzung hinter der ω-Front definiert, und es sind dann einzig die Werte von ${}^{\omega}Rf_{beob}$ bei theoretischen Erwägungen brauchbar.

Additivität von ${}^{\beta}Rm$ und ${}^{\gamma}Rm$. Wir wollen jetzt die in den Abb. 64a und b dargestellten Daten unter diesem neuen Gesichtspunkt betrachten. Die durch Kurven verbundenen Punkte sollten auf Geraden liegen. Sie tun dies nicht, weil die der Rm-Berechnung zugrunde liegenden Werte von Rf_{beob} konventionell auf die α-Front bezogen wurden. Ersetzt man aber ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ durch ${}^{\beta}Rf_{beob}$ bzw. ${}^{\gamma}Rf_{beob}$, berechnet man

$${}^{\beta}Rm = \log\left(\frac{1}{{}^{\beta}Rf_{beob}} - 1\right) \quad \text{bzw.} \quad {}^{\gamma}Rm = \log\left(\frac{1}{{}^{\gamma}Rf_{beob}} - 1\right)$$

[1] Wir werden indessen noch sehen, daß der Fehler manchmal zu klein ist, um praktisch ins Gewicht zu fallen.

[2] Vgl. Fußnote 2 auf S. 120.

[3] Vgl. dazu [74].

und trägt man die resultierenden Werte gegen die jeweilige Anzahl von CH_2-Gruppen auf, so kommen zusammengehörende Punkte im Bereich von 1—6 CH_2-Gruppen auf eine Gerade zu liegen (Abb. 66a und b) [*56, 70*]. Die Abweichung bei 7 CH_2-Gruppen ist wohl der Unsicherheit der Rf-Bestimmung in der Gegend von $Rf \approx 1$ zuzuschreiben.

Unter der Voraussetzung, daß die Werte von Rf_{beob} *in korrekter Weise gemessen werden, ist die Martinsche Beziehung* (22) *also auch in gewissen Fällen von Fließmittelentmischung brauchbar.*

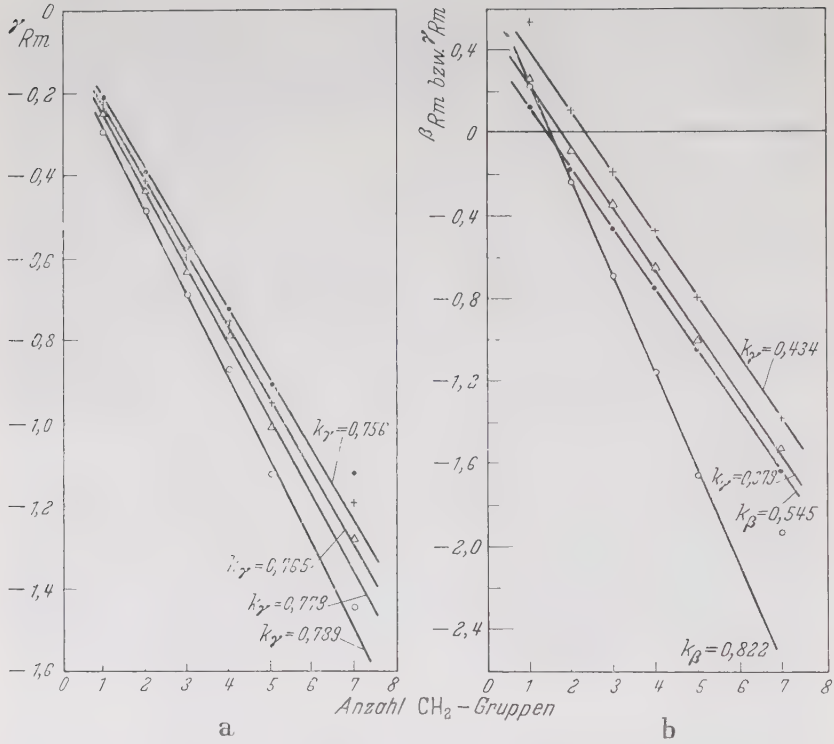

Abb. 66. Rm ist additiv, weil bei der Bestimmung von Rf_{beob} die Fließmittelentmischung berücksichtigt wurde (vgl. Text) [*56, 70*].

a) Versuche wie in Abb. 64a.
Fließmittel aus 3 Komponenten: nur α- und γ-Front sind sichtbar; $Rf_{beob} = {}^{\gamma}Rf_{beob}$

b) Versuche wie in Abb. 64b.
Fließmittel aus 2 Komponenten: beide Fronten sichtbar; $Rf_{beob} = {}^{\beta}Rf_{beob}$
Fließmittel aus 3 Komponenten: alle Fronten sichtbar; $Rf_{beob} = {}^{\gamma}Rf_{beob}$

Setzt man nach (33) ${}^{\omega}\overline{Rf}_{beob} \cdot \xi = {}^{\omega}Rf_{wahr}$, so bemerkt man oft, daß ξ einen Wert von nahezu 1 besitzen muß. Es liefern nämlich ${}^{\omega}\overline{Rf}_{beob}$ bis hinauf zu etwa 0.95 additive ${}^{\omega}Rm$-Werte! Offenbar setzt der bei

α-Fronten beobachtete relativ frühe Abfall des Phasenverhältnisses[1] hier erst in unmittelbarer Frontnähe ein.

Zulässige und unzulässige Benützung konventionell gemessener Rf-Werte. Wir kommen nochmals auf Abb. 65 zurück. Mißt man für die in der γ-Zone befindlichen Flecken die Werte ${}^{\alpha}Rf_{beob}$, so bemerkt man, daß sie sich mit dem Streckenverhältnis *Eintauchspiegel-Startpunkt*: *Eintauchspiegel-α-Front* verändern. Es ist instruktiv, diese Abhängigkeit[2] und die Beziehung zwischen ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ und dem auf die korrekte Front bezogenen Rf näher zu betrachten. Am übersichtlichsten sind die Verhältnisse bei Entmischung eines Fließmittels aus nur zwei Komponenten. Die Abb. 67a und b stellen entsprechende Chromatogramme schematisch dar. In Abb. 67a ist der Substanzfleck bis zum Moment der Beobachtung hinter, in Abb. 67b vor der β-Front gewandert.

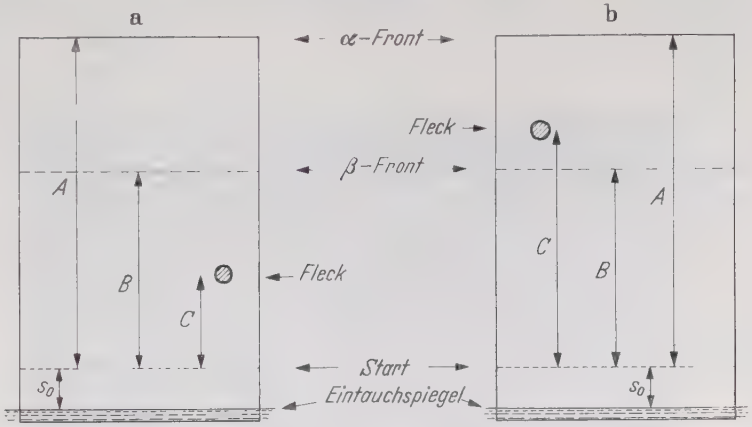

Abb. 67. Entmischung eines Fließmittels aus 2 Komponenten. Der Substanzfleck wandert hinter der β-Front (67a) oder vor der β-Front (67b). Vgl. die Diskussion im Text. [70]

Bezeichnet man die Strecke *Eintauchspiegel-Start* als s_0, die Strecke *Start-α-Front* als A, die Strecke *Start-β-Front* als B und die Strecke *Start-Fleckmittelpunkt* als C, dann gilt für Abb. 67a [70]:
Gesamtlaufstrecke des Fließmittels: ${}^{\alpha}z_f = z_f = A + s_0$, Laufstrecke der β-Front: ${}^{\beta}z_f = k_\beta \cdot z_f = B + s_0$, ferner

$$\frac{{}^{\alpha}Rf_{beob}}{{}^{\beta}Rf_{beob}} = \frac{\frac{C}{A}}{\frac{C}{B}} = \frac{B}{A} = \frac{k_\beta \cdot z_f - s_0}{z_f - z_0}, \text{ und}$$

$${}^{\alpha}Rf_{beob} = \frac{k_\beta \cdot z_f - s_0}{z_f - s_0} \, {}^{\beta}Rf_{beob} \qquad (37)$$

${}^{\alpha}Rf_{beob}$ erreicht seinen maximalen Wert bei $s_0 = 0$; es kann also ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ nicht größer werden als

$${}^{\alpha}Rf_{max} = k_\beta \cdot {}^{\beta}Rf_{beob} \qquad (37a)$$

[1] Vgl. Abb. 59 bzw. 60.

[2] Sie hat nichts zu tun mit der Veränderlichkeit von Rf_{beob} nach (30) (vgl. S. 113).

${}^{\beta}Rf_{beob}$ ist bei gegebenem ${}^{\beta}z_f$ praktisch unabhängig von s_0. Man muß zwar auch hier mit einem örtlich veränderlichen Benetzungsgrad rechnen (vgl. Abb. 59 und 60), es erscheint aber durchaus möglich, daß sich das Phasenverhältnis in der Nähe von Entmischungslinien weniger stark verändert als in der Nähe der α-Front.

Der jeweilige Unterschied zwischen ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ und ${}^{\alpha}Rf_{max}$ läßt sich durch das Verhältnis dieser beiden Größen übersichtlich darstellen. Es ist

$$\frac{{}^{\alpha}Rf_{beob}}{{}^{\alpha}Rf_{max}} = \frac{\dfrac{k_\beta \cdot z_f - s_0}{z_f - s_0} \cdot {}^{\beta}Rf_{beob}}{k_\beta \cdot {}^{\beta}Rf_{beob}}$$

Daraus folgt durch Umformung

$$\frac{1 - \dfrac{{}^{\alpha}Rf_{beob}}{{}^{\alpha}Rf_{max}}}{\dfrac{1}{k_\beta} - \dfrac{{}^{\alpha}Rf_{beob}}{{}^{\alpha}Rf_{max}}} = \frac{s_0}{z_f} \qquad (38)$$

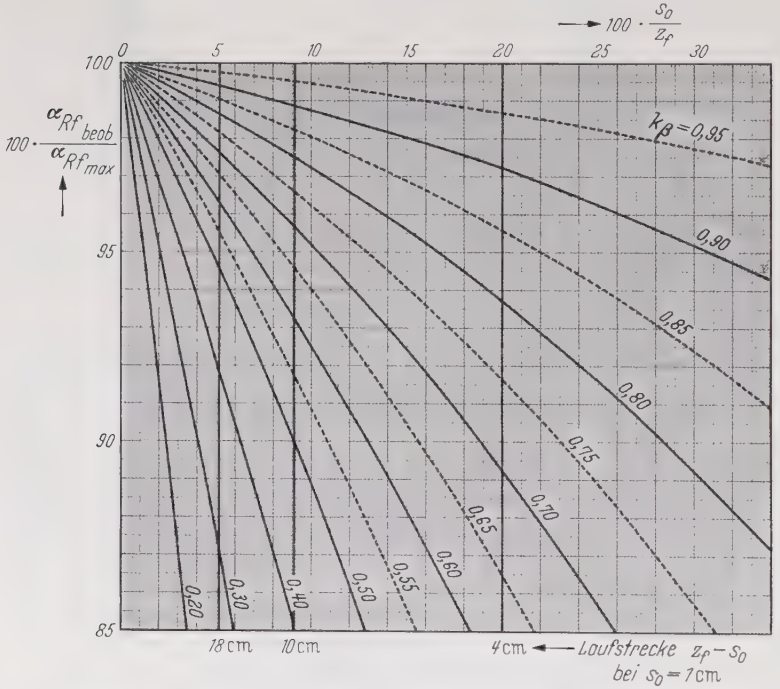

Abb. 68. Einfluß des Streckenverhältnisses Eintauchspiegel-Start : Eintauchspiegel-Front ($s_0 : z_f$) auf ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ bei Fließmittelentmischung (2 Komponenten) und Substanzwanderung hinter der β-Front, k_β ist das Verhältnis der Wanderungsgeschwindigkeiten von α- und β-Front. [70]

Nach (38) ist das Verhältnis ${}^{\alpha}Rf_{beob} : {}^{\alpha}Rf_{max}$ eine Funktion des Parameters k_β und der Variablen s_0/z_f. In Abb. 68 ist dies graphisch dargestellt; ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ kann daraus direkt in Prozenten von ${}^{\alpha}Rf_{max}$ abgelesen werden. Von praktischer Bedeutung ist nur der Abszissenbereich 5 bis 20 (Laufstrecken 18 cm bis 4 cm bei $s_0 = 1$ cm).

Erste Folgerung aus Abb. 68:

Die prozentuale Veränderung von ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$ beim Übergang vom Abszissenwert 5,2 nach 9,1 (Abb. 68) liegt bei $k_\beta > 0{,}5$ in der Größe des prozentualen Meßfehlers[1] (Tab. 8) und kann deshalb vernachlässigt werden. Erstreckt sich der Abszissenbereich von 5,2 nach 20, so gilt dies nur noch, wenn $k_\beta > 0{,}9$ ist! Jenseits der genannten Grenzen hängt ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$ merklich bis stark vom Streckenverhältnis *Eintauchspiegel-Start* zu *Eintauchspiegel-α-Front* ab.

Zweite Folgerung aus Abb. 68:

Im Abszissenbereich 5,2–9,1 werden bei $k_\beta \geqq 0{,}85$ die Werte von ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$ und ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{max}$ innerhalb des Meßfehlers identisch (prozentualer Meßfehler > 2 %) und unabhängig von $s_0 : z_t$. Mit

$$ {}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob} \approx {}^{\alpha}\overline{Rf}_{max} \text{ und } {}^{\alpha}\overline{Rf}_{max} = k_\beta \cdot {}^{\beta}\overline{Rf}_{beob} \qquad (37a) $$

gilt auch die Näherung

$$ {}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob} \cdot \frac{1}{k_\beta} \approx {}^{\beta}\overline{Rf}_{beob}. $$

Ist nun

$$ {}^{\beta}\overline{Rf}_{beob} = \frac{1}{\xi} \cdot {}^{\beta}Rf_{wahr} \qquad \text{(Seite 122)}, $$

so folgt

$$ {}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob} \cdot \frac{1}{k_\beta} \approx \frac{1}{\xi} \cdot {}^{\beta}Rf_{wahr}, \qquad (39) $$

bzw.

$$ {}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob} \cdot \xi' \approx {}^{\beta}Rf_{wahr}. \qquad (39a) $$

Tabelle 8. *Unsicherheit beim Messen und Vergleichen von zwei Rf-Mittelwerten aus je 8 Einzelwerten* (vgl. Text)

${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$ *	möglicher prozentualer Meßfehler $\pm \frac{0{,}022 \cdot 100}{{}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}}$ % *
0,9	2,5
0,8	2,8
0,7	3,2
0,6	3,8
0,5	4,5
0,4	5,6
0,3	7,5
0,2	11,3

* Man beachte beim Vergleich der Tabellen-Werte mit den aus Abb. 68 zu entnehmenden Zahlenwerten daß ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$ immer kleiner als k_β ist!

ξ' bezieht sich im Unterschied zu ξ auf ein chromatographisches System[2] mit Fließmittelentmischung [*70*]. Solange sich ξ' wie ξ zahlenmäßig zwischen 1 und 1,2 bewegt, sind aus (39a) dieselben Schlüsse wie aus (33) zu ziehen! In der Tat ist anzunehmen, daß die Addivität von Rm in Abb. 61 bzw. Abb. 63 eigentlich auf die Gültigkeit von (39a) zurückzuführen ist.

Die für jene Experimente verwendeten Fließmittel unterliegen ohne Zweifel auch der Entmischung. Die β-Fronten sind zwar nicht sichtbar, lassen sich aber durch die in Abb. 65 illustrierte Methode nachweisen. Sie liegen wegen der Ähnlichkeit zwischen Alkoholen und Wasser in der Nähe der α-Front. Für Methanol/Wasser (70 + 30) z. B. ist für k_β der Wert 0,95 bestimmt worden [*56*]. Der in der Legende

[1] Der mittlere Fehler $s_{\overline{Rf}}$ des Mittelwertes $\overline{Rf}_{beob}$ beträgt ungefähr $\frac{0{,}015}{\sqrt{n}}$, wobei n die Anzahl der Rf-Einzelmessungen bedeutet [*71*]. Unter Berücksichtigung der statistischen Regel zum Vergleich zweier Mittelwerte ergibt sich bei n = 8 eine mögliche $\overline{Rf}_{beob}$-Schwankungsbreite von $\pm \sqrt{2} \cdot 3 \cdot s_{\overline{Rf}} = \pm 0{,}022$ Rf-Einheiten. Dieser „experimentelle Meßfehler" ist ziemlich unabhängig vom Zahlenwert von $\overline{Rf}_{beob}$; bei Benützung der Abb. 68 ist er in den auf den Zahlenwert von $\overline{Rf}_{beob}$ bezogenen „prozentualen Meßfehler" umzurechnen (Tab. 8).

[2] Vgl. Fußnote 2, S. 103.

zu Abb. 61 erwähnte Eisessig-Zusatz verursacht zweifellos die Ausbildung einer unsichtbaren γ-Front, der ebenfalls ein sehr hoher $k\gamma$-Wert zukommen dürfte.

Wenden wir uns schließlich dem in Abb. 67 b dargestellten Fall zu. Im Augenblick der Beobachtung gilt ${}^{\alpha}Rf_{beob} = \frac{C}{A}$ – vgl. dazu S. 123 – und folglich auch

$$ {}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob} \cdot \xi = Rf_{wahr} \qquad (33) $$

Bei Fortsetzung der Chromatographie verringert sich nun das Verhältnis $s_0 : z_f$. Daraus ergeben sich drei Möglichkeiten:

Erstens: Die β-Front kann den Flecken nicht einholen, weil

$$ u_{Fleck} > u_{\beta\text{-Front}} \qquad (u = \text{Geschwindigkeit}), $$

$$ {}^{\alpha}Rf_{beob} \cdot \frac{dA}{dt} > k_{\beta} \cdot \frac{dA}{dt}, $$

$$ {}^{\alpha}Rf_{beob} > k_{\beta}. $$

Das im zusammengesetzten Fließmittel beobachtete ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$ ist und bleibt bis zum Versuchsabbruch gleich wie der Wert von $\overline{Rf}_{beob}$, den man findet, wenn die Substanz nur mit der rascher wandernden Komponente des Fließmittels chromatographiert wird.

Zweitens: Der Fleck wandert in konstantem Abstand von der β-Front, weil

$$ u_{Fleck} = u_{\beta\text{-Front}}, $$

$$ {}^{\alpha}Rf_{beob} = k_{\beta}. $$

Es besteht wie oben kein Unterschied zur Chromatographie in der betreffenden reinen Fließmittelkomponente.

Drittens: Der Abstand zwischen Fleck und β-Front verkleinert sich, weil

$$ u_{Fleck} < u_{\beta\text{-Front}}, $$

$$ {}^{\alpha}Rf_{beob} < k_{\beta}, $$

und der Fleck wird von der Front eingeholt, wenn

$$ A = \frac{s_0(1 - k_{\beta})}{k_{\beta} - {}^{\alpha}Rf_{beob}}. $$

Nun ändert sich die relative Wanderungsgeschwindigkeit $\frac{u_{Fleck}}{u_{\alpha\text{-Front}}}$ des Flecks. Im extremen Fall entspricht sie von jetzt an der relativen Wanderungsgeschwindigkeit der β-Front (${}^{\beta}Rf = 1$); gewöhnlich wird sie kleiner sein (${}^{\beta}Rf < 1$). So oder so wird es durch Beobachtung nach Versuchsabbruch nicht mehr in einfacher Weise möglich sein, dem Fleck einen vernünftigen Rf-Wert zuzuordnen.

Regeln für die Praxis. *Zusammenfassend können wir nun folgendes über* Rf-*Wert-Bestimmung bei Fließmittel-Entmischung festhalten* [70]: Substanzen, die vor der β-Front wandern, werden in ihrem chromatographischen Verhalten durch die Entmischung des Fließmittels nicht beeinflußt; das Fließmittel hat aber nicht die im Fließmittel-Behälter

herrschende Zusammensetzung. Man bestimmt in konventioneller Weise ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$. ${}^{\alpha}Rm$ ist additiv.

Bei Substanzen, die hinter der β-Front wandern, sind mehrere Fälle zu unterscheiden.

1. Es ist $k_\beta > 0{,}85$. Man darf die β-Front vernachlässigen und in konventioneller Weise ${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}$ bestimmen. ${}^{\alpha}Rm$ ist additiv.

2. Es ist „unterer Grenzwert" $< k_\beta < 0{,}85$, wobei der „untere Grenzwert" zwischen 0,2 und 0,4 liegen mag. Beginnt die Substanzwanderung erst, wenn die β-Front den Startpunkt überschreitet, so ist ${}^{\beta}\overline{Rf}_{beob}$ zu bestimmen; ${}^{\beta}Rm$ ist additiv. Beginnt aber eine merkliche Wanderung schon früher, so ist keine vernünftige Rf-Messung möglich.

3. Es ist $k_\beta <$ „unterer Grenzwert". Unter diesen Umständen sind Werte von ${}^{\beta}Rf_{beob}$ wohl angebbar; die entsprechenden Rm-Werte sind aber nicht additiv.

4. Gibt es außer der β-Front noch eine γ-Front, so werden die Verhältnisse evtl. unübersichtlich; man halte sich versuchsweise an die Regeln 1–3.

5. Wandern die Flecken hinter der ω-Front, so gelten die Regeln 1–3 mit k_ω statt k_β; zu bestimmen ist also zunächst k_ω und gegebenenfalls ${}^{\omega}\overline{Rf}_{beob}$. Die Verhältnisse sind insofern übersichtlich, als die Fließmittelzusammensetzung derjenigen im Fließmittelbehälter entspricht.

Verwendete Symbole

A	Strecke Start-α-Front	123ff.
A_{rev}	reversible Arbeit	105
A	vgl. Seite	112
$\frac{A}{W}$	Proportionalitätsfaktor zwischen lokaler Fließmittelgeschwindigkeit und Frontgeschwindigkeit	112, 115
a und b	Koeffizienten	109
B	Strecke Start-β-Front	123
b	Bandenbreite in cm	100, 101
C	Strecke Start—Fleckenmittelpunkt	123, 126
c	Konzentration	83
c	von GIDDINGS verwendeter Verteilungsparameter	112
c_M	Konzentration in Molprozenten	119
$c_V(r)$	Konzentration in Kammer Nr. r nach Ausfluß des konstanten Volumens $V = v_m - \frac{v_m}{n}$	95
c_o	Anfangskonzentration in Röhrchen (Boden, Kammer) No.1	81, 86ff.
c_r	Konzentration in Röhrchen (Boden, Kammer) No. r.	81

$c\,(V)$	Konzentration der aus einem Signerschen Trog ausfließenden Lösung nach Ausfluß des Volumens V	85 ff.
$c_n\,(V)$	c (V) bei Kammerzahl n	83 ff.
c'_m	beliebige Konzentration in der mobilen Phase	105
c'_s	beliebige Konzentration in der stationären Phase	105
D_x	Diffusionskoeffizient in Richtung x	128
D_y	Diffusionskoeffizient in Richtung y	128
d	Wanderungsstrecke des Bandenmaximums	100 ff.
E_{max}	Extinktion eines Farbfleckens im Maximum	129
e	Basis der natürlichen Logarithmen	
F	Fläche unter c (V)-Kurve (Gauss)	127
F_x / F_y	Flächen unter der Extinktionskurve	129
f (Z)	Überlappungsgrad	94
G, G_o, G_μ ...	Konstanten in der Martin-Beziehung	106
H	theoretische Bodenhöhe = HETP (height equivalent to a theoretical plate)	100 ff.
h	Scheitelhöhe der c (V)-Kurve (Gauss)	127
K	konzentrationsunabhängiger Verteilungs- bzw. Adsorptionskoeffizient (der letztere ist nur bei sehr kleinen Konzentrationen als konzentrationsunabhängig zu betrachten!)	88 ff.
K′	K bei nicht genau angebbarem Verteilungsmechanismus (Chromatographiersäule)	104 ff.
k_β, k_γ ... k_ω	Verzögerungsfaktoren	118 ff.
L	Länge einer Chromatographiersäule	100 ff.
M	Mittelwert (Erwartungswert) der Poissonverteilung	90, 98
M_o	Substanzeinwaage	87, 89
$M_{r_{max}}$	Substanzmenge im Säulensegment mit der größten Substanzdichte	99
$M_V(r)$	Substanzmenge in Kammer No. r (Signerscher Trog) nach Ausfluß des Volumens V	95 ff.
n	Kammerzahl	82 ff.
n′	wirksame Kammerzahl	85 ff.
p	Bruchteil der Gesamtsubstanzmenge, welche sich in der mobilen Phase einer Kammer (theoretischer Boden, Säulensegment) befindet	89 ff.
p′	p bei nicht genau angebbarem Verteilungsmechanismus (Chromatographiersäule)	97 ff.
q	Bruchteil der Gesamtsubstanzmenge, welche sich in der stationären Phase einer Kammer (theoretischer Boden, Säulensegment) befindet	89 ff.
R	Gaskonstante	105, 106
Ra	Rm-Wert bei Assoziation	108
Rf	Definition Seite	95, 104, 108, 111

Rf_{beob}	konventionell gemessener Rf-Wert $\left(\frac{\text{Wanderungsstrecke der Substanz}}{\text{Wanderungsstrecke der Front}}\right)$	111ff.
$\overline{Rf}_{beob}$	Mittelwert aus Rf_{beob}-Einzelwerten	115ff.
Rf_{int}	„innerer" Rf-Wert	111ff.
$Rf_{int,\ Endwert}$	Endwert der Variablen Rf_{int}	113, 114
Rf_{wahr}	$= Rf_{int,\ Endwert}$	114ff.
${}^{\alpha}Rf_{beob}, {}^{\beta}Rf_{beob}, \ldots {}^{\omega}Rf_{beob}$	konventionell gemessene Rf-Werte bezogen auf α-, β-, ω-Front	121ff.
${}^{\alpha}\overline{Rf}_{beob}, {}^{\beta}\overline{Rf}_{beob}, \ldots {}^{\omega}\overline{Rf}_{beob}$	Mittelwerte aus ${}^{\alpha}Rf_{beob}$-, ${}^{\beta}Rf_{beob}$-, ... ${}^{\omega}Rf_{beob}$-Einzelwerten	122ff.
${}^{\alpha}Rf_{max}$	obere Grenze von ${}^{\alpha}Rf_{beob}$ bei verschwindendem s_0	123
${}^{\beta}Rf_{wahr}, {}^{\gamma}Rf_{wahr}, \ldots {}^{\omega}Rf_{wahr}$	wahre Rf-Werte, bezogen auf β-, γ-, ... ω-Front	122, 125
Rm	$= \log\left(\frac{1}{Rf} - 1\right)$	106ff.
Rm_{beob}	Rm aus Rf_{beob}	115ff.
$\overline{Rm}$	Mittelwert aus Rm-Einzelwerten	
Rm′	$= Rm + \log \xi$	115ff.
${}^{\alpha}Rm, {}^{\beta}Rm, \ldots {}^{\omega}Rm$	aus ${}^{\alpha}Rf, {}^{\beta}Rf, \ldots {}^{\omega}Rf$ berechnete Rm-Werte	121
r	Kammer-(Boden-, Segment-) Nummer	95
r_{max}	r mit der größten Substanzdichte	95ff.
S_0	eine substituierbare Substanz	106
s	von der Substanz zurückgelegte Wegstrecke	111
s_0	Strecke Eintauchspiegel-Start	111ff., 123
$s_{\overline{Rf}_{beob}}$	Standardabweichung von $\overline{Rf}_{beob}$	125
$s_{\overline{Rm}}$	Standardabweichung von $\overline{Rm}$	116
T	absolute Temperatur in °K	105, 106
t	Zeit	103, 109, 110
u	Durchflußgeschwindigkeit	85
u	$= \left(\frac{V}{v_m} - 1\right)\sqrt{n}$	84
u_z	Geschwindigkeit eines Substanzfleckens an der Stelle z	112ff.
V	seit Versuchsbeginn ausgeflossenes Volumen (Ausfluß)	83ff.
V_B	Bandenbreite in Volumeneinheiten	101
V_R	Retentionsvolumen (Chromatographiersäule)	97ff.
V_T	Ausfluß bei Fraktionentrennung (Beschreibung von c(V) nach Gauss)	91ff.
$V_{T,\ korr}$	korrigiertes V_T	93
V_{max}	Ausfluß (Signerscher Trog) bis zum Konzentrationsmaximum, identisch mit Retentionsvolumen	90ff.
v_F	Volumen des Fließmittels innerhalb einer Chromatographiersäule	97ff.

v_f	Geschwindigkeit der Fließmittelfront	112ff.
v_m	Gesamtvolumen der mobilen Phase im Signerschen Trog	82ff.
v_s	Gesamtvolumen der stationären Phase im Signerschen Trog	88ff.
v_z	Fließmittelgeschwindigkeit an der Stelle z	112
W	vgl. Seite	112
$w_{1/2}$	Breite einer Gauss-Kurve in halber Scheitelhöhe	127
Z	Trennparameter	92, 94
z	Distanz von der Startlinie des Fließmittels bis zu einem Beobachtungspunkt längs der Fließmittellaufstrecke	110ff.
z_f	Wanderungsstrecke der Fließmittelfront	109ff.
$^{\alpha}z_f, ^{\beta}z_f, \ldots {}^{\omega}z_f$	Laufstrecke der α-, β-, ... ω-Front	118, 123, 124
α-, β-, γ-, ... ω-Front:	Frontbezeichnung bei Fließmittelentmischung	118ff.
$\Delta 1$	halbe sichtbare Bandenbreite	103
ΔF	reversible Arbeit (Überführungsenergie) unter Standardbedingungen)	105
ΔF_o	ΔF für eine substituierbare Substanz S_0	106
ΔF_X, ΔF_Y	Änderung der Überführungsenergie infolge Einführung eines Substituenten (X, Y ...) in S_0	106
ΔF_μ	Änderung der freien Überführungsenergie ΔF_o infolge der Einführung des Substituenten μ in die substituierbare Substanz S_o	106
ΔG	freie Enthalpie für Substanzübergang von der flüssigen in die Gasphase	105 (Fußn.)
ΔRm	Änderung von Rm bei Veränderung des chromatographischen Systems	107
Δv_m	Volumenkorrektur auf Seite	89 (Fußn.)
$\triangle V$	Volumenkorrektur auf Seite	93
δ	Fehler in Rm', bedingt durch Benützung von Rf_{beob}	116
ζ	Koeffizient	119
$\varkappa$	Koeffizient	119
ξ	Korrekturfaktur für Rf_{beob}	115ff.
ξ'	ξ bei Fließmittelentmischung	125
π	= 3,14159 ...	
ϱ	Phasenverhältnis	89ff.
ϱ'	veränderliches Phasenverhältnis	111, 113
Σ	$= \sigma_{\text{Substanz A}} + \sigma_{\text{Substanz B}}$	92, 98
σ	mittlere Abweichung in der Normalverteilungsfunktion (Standard-Abweichung)	90ff.
τ	unabhängige Variable in der Normalverteilungsfunktion	84, 94, 99
$\Phi(\upsilon)$	Fehlerintegral	83ff.
Ψ	Substanzdichte	128
ω	Rührgeschwindigkeit	85
ω	Wanderungsgeschwindigkeit	103

Literatur zu Kapitel H, Theoretische Grundlagen

[1] Martin, A. J. P.: Endeavour **6**, 21 (1947).
[2] Giddings, J. C.: J. Chromatog. **2**, 48 (1959).
[3] Martin, A. J. P., and R. L. M. Synge: Biochem. J. **35**, 1358 (1941).
[4] Weissberger, A.: Technique of organic chemistry, Vol. 3, p. 529 –311. Interscience Publishers Inc. 1950.
[5] Wilson, J. N.: J. Am. Chem. Soc. **62**, 1583 (1940).
[6] de Wault, D.: J. Am. Chem. Soc. **65**, 532 (1943).
[7] Glückauf, E.: Discussions Faraday Soc. **7**, 12 (1949).
[8] Smit, W. M.: Discussions Faraday Soc. **7**, 38 (1949).
[9] Glückauf, E.: Trans. Farady Soc. **51**, 34 (1955).
[10] — Trans. Faraday Soc. **51**, 1540 (1955).
[11] van Deemter, J. J., F. J. Zuiderweg and A. Klinkenberg: Chem. Eng. Sci. **5**, 271 (1956).
[12] Giddings, J. C.: J. Chromatog. **2**, 44 (1959).
[13] Keller, R. A., and J. C. Giddings: J. Chromatog. **3**, 205 (1960).
[14] Ruoff, A. L., and J. C. Giddings: J. Chromatog. **3**, 438 (1960).
[15] Bogue, D. C.: Anal. Chem. **32**, 1777 (1960).
[16] Hamilton, P. B., D. C. Bogue and R. A. Anderson: Anal. Chem. **32**, 1782 (1960).
[17] Giddings, J. C.: J. Chromatog. **5**, 46 (1961).
[18] Signer, R., K. Allemann, E. Köhli, W. Lehmann, H. Meyer u. W. Ritschard: Dechema-Monograph. **27**, 32—44 (1956).
[19] Handbook of Chemistry and Physics: 38. Aufl. Cleveland, Ohio: Chemical Rubber Publishing Co. 1956—1957.
[20] Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
[21] Hadwiger, H.: Experientia **9**, 391 (1953).
[22] Diss. H. Meyer: Universität Bern 1956.
[23] Keulemans, A. I. M.: Gas Chromatography. New York: Reinhold Publishing Corp. 1957.
[24] Hecker, E.: Verteilungsverfahren im Laboratorium. S. 87. Weinheim: Verlag Chemie 1955.
[25] Spackman, D. H., W. H. Stein and S. Moore: Anal. Chem. **30**, 1190 (1958).
[26] z. B. Stepanov, V., D. Handschuh u. F. A. Anderer: Z. Naturforsch. **166**, 626 (1961).
[27] Bennich, H.: Biochim. et Biophys. Acta **51**, 265 (1961).
[28] Wieland, Th., u. H. Merz: Chem. Ber. **85**, 731 (1952).
[29] Claesson, S.: Arkiv Kemi Mineral. Geol. A **24**, 16 (1947).
[30] Hagdahl, L.: Acta Chem. Scand. **2**, 574 (1948).
[31] — Sci. Tools **1**, 21 (1954).
[32] Alm, R. S., R. J. P. Williams u. A. Tiselius: Acta Chem. Scand. **6**, 826 (1952).
[33] Kauman, W. G., and A. Bak: Nature **182**, 743 (1958).
[34] Khan, M. A.: Nature **186**, 800 (1960).
[35] Kieselbach, R.: Anal. Chem. **32**, 880 (1960).
[36] Giddings, J. C.: J. Chromatog. **5**, 61 (1961).
[37] Pohloudek-Fabini, R., u. Wollmann: Pharmazie **15**, 590 (1960).
[38] Moore, S., and W. H. Stein: Ann. N. Y. Acad. Sci. **49**, 265 (1948).
[39] Martin, A. J. P.: Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Engl.) **3**, 4 (1950).
[40] — Ann. Rev. Biochem. **19**, 518—520 (1950).
[41] Kováts, E.: Helv. Chim. Acta **41**, 1915, 1928 (1958).
[42] Shriner, R. L., R. C. Fuson and D. Y. Curtin: The systematic identification of organic compounds, 4. Aufl. Kapitel 6. New York: John Wiley & Sons Inc. 1956.
[43] Franc, J., and J. Jokl: J. Chromatog. **2**, 423 (1959) und frühere Arbeiten.
[44] Kováts, E.: Helv. Chim. Acta **42**, 2709 (1959).
[45] Bate-Smith, E. C., and R. G. Westall: Biochim. et Biophys. Acta **4**, 427 (1950).
[46] Pardee, A. B.: J. Biol. Chem. **190**, 757 (1951).

[47] Gasparic, J., u. M. Vecera: Collection Czechosl. Chem. Commun. **24**, 1822 (1959).
[48] Roux, D. G., and S. R. Evelyn: J. Chromatog. **1**, 537 (1958).
[49] Grebenovský, E.: Z. anal. Chem. **185**, 290 (1962).
[50] James, A. T., and A. J. P. Martin: Biochem. J. **50**, 679 (1959).
[51] Ray, N. H.: J. Appl. Chem. (London) **4**, 21 (1954).
[52] James, A. T.: Biochem J. (London) **52**, 242 (1952).
[53] Kováts, E.: Z. anal. Chem. **181**, 351 (1961).
[54] French, D., and G. M. Wild: J. Am. Chem. Soc. **75**, 2612 (1953).
[55] Reichl, E. R.: Monatsh. Chem. **86**, 69 (1955).
[56] Diss. G. Pataki, Universität Basel, 1962.
[57] Moore, T. B., and C. G. Baker: J. Chromatog. **1**, 512 (1958).
[58] Schauer, H. K., u. R. Bulirsch: Z. Naturforsch. **10**b, 683 (1955).
[59] — — Naturwiss. **43**, 34 (1956).
[60] — — Z. Naturforsch. **13**b, 327 (1958).
[61] Macek, K.: Experientia **17**, 162 (1961).
[62] Brenner, M., u. G. Pataki: Helv. Chim. Acta **44**, 1420 (1961).
[63] — — Helv. Chim. Acta (im Druck).
[64] — u. A. Niederwieser: Experientia **17**, 237 (1961).
[65] Müller, R. H., and D. L. Clegg: Anal. Chem. **23**, 296 (1951).
[66] Kowkabaly, G. M., and H. G. Cassidy: Anal. Chem. **22**, 817 (1950):
[67] Wood, S. E., and H. H. Strain: Anal. Chem. **26**, 260 (1954).
[68] Giddings, J. C., G. H. Stewart and A. L. Ruoff: J. Chromatog. **3**, 239 (1960).
[69] Franc, J., u. J. Jokl: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **21**, 1161 (1956).
[70] Diss. A. Niederwieser, Universität Basel, 1962.
[71] Brenner, M., A. Niederwieser, G. Pataki u. A. R. Fahmy: Experientia **18**, 101 (1962).
[72] Brenner, M., u. A. Niederwieser: Experientia **16**, 378 (1960).
[73] Boman, H. G.: Nature **170**, 703 (1952).
[74] Bungenberg de Jong, H. G., u. J. Th. Hoogeveen: Proc. Acad. Sci. (Amsterdam, Series B **64**, 1, 18, 167, 183 (1961); **63**, 228, 243, 383 (1960).
[75] Tiselius, A.: Arkiv Kemi, Mineral. Geol. **14** B, Nr. 22 (1940).
[76] Claesson, S.: Arkiv Kemi, Mineral. Geol. **23**A. Nr. 1 (1946).
[77] — Arkiv Kemi, Mineral. Geol. **24** A, Nr. 7 (1947).
[78] Griffiths, J., D. James and C. Phillips: Analyst **77**, 897 (1952).
[79] Brenner, M., u. A. Vetterli: Helv. Chim. Acta **40**, 943—949 (1957).
[80] Calvin, J., J. C. Giddings and Roy A. Keller: J. Chromatog. **2**, 626 (1959).
[81] Dahn, H., u. H. Fuchs: Helv. Chim. Acta **45**, 261 (1962).
[82] Jäger, H., A. Ramel u. O. Schindler: Helv. Chim. Acta **40**, 1310 (1957).

Curriculum vitae

Am 10. August 1935 wurde ich als drittes Kind des Kaufmanns Josef Niederwieser und seiner Gattin Ursula, geb. Mayer, in Laupheim (Württemberg) geboren. Ich besuchte 1941—1945 die Primarschule, 1945—1951 das Realgymnasium in Laupheim und anschließend das Humanistische Gymnasium in Ehingen (Donau), wo ich 1955 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester desselben Jahres begann ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Naturwissenschaften und hörte dort K. Brodersen, E. Bünning, G. Kortüm, W. Kossel, E. Menzel, W. Rüdorff, W. Schweizer, K. Spangenberg und G. Wittig. Im Sommersemester 1956 setzte ich meine Studien in Chemie als Hauptfach und Mineralogie, physikalischer Chemie und Pharmakologie als Nebenfächer an der Universität Basel fort. Meine Lehrer waren hier: P. Beart, M. Brenner, K. Bucher, H. Dahn, H. Erlenmeyer, S. Fallab, C. Grob, F. Grün, P. Huber, W. Kuhn, H. Labhart, E. Miescher, M. Monnier, T. Reichstein, O. Schindler, Ch. Tamm, E. Wenk und R. Wizinger. Meine Dissertation entstand in der Zeit von Oktober 1959 bis Juni 1962 unter der Leitung von Prof. Dr. Max Brenner.

Alois Georg Niederwieser